

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
 - TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
 - FADED TEXT
 - ILLEGIBLE TEXT
-
- SKEWED/SLANTED IMAGES
 - COLORED PHOTOS
 - BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
 - GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00, C12N 7/01, A61K 39/235, C12N 5/10, 15/12		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/23867 (43) Date de publication internationale: 8 septembre 1995 (08.09.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00233 (22) Date de dépôt international: 28 février 1995 (28.02.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/02445 3 mars 1994 (03.03.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DENEFFLE, Patrice [FR/FR]; 45, avenue des Fussillés-de-Chateaubriand, F-94100 Saint-Maur (FR). LATTI, Martine [FR/FR]; 141, rue de Paris, F-94220 Charenton-le-Pont (FR). PERRI-CAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Ecrosnes (FR). VIGNE, Emmanuelle [FR/FR]; 60, rue Jean-le-Galleu, F-94200 Ivry-sur-Seine (FR). (74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).			(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG). Publiée Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: INTEGRATIVE RECOMBINANT ADENOVIRUSES, PREPARATION THEREOF AND THERAPEUTICAL USES THEREOF

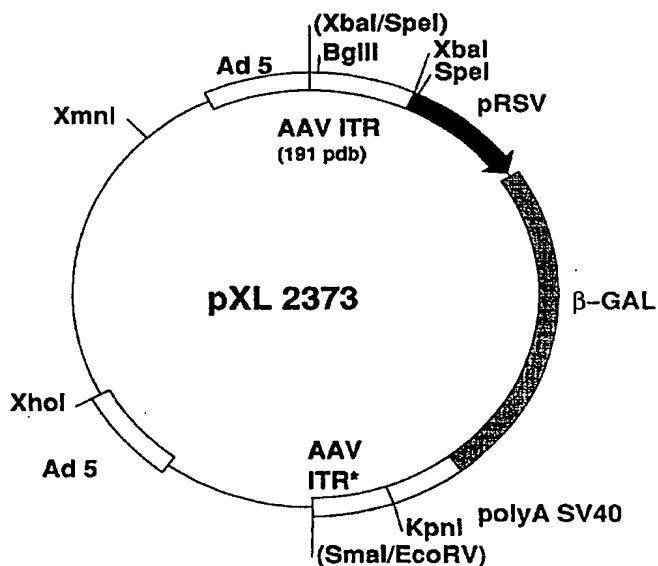
(54) Titre: ADENOVIRUS RECOMBINANTS INTEGRATIFS, LEUR PREPARATION ET LEUR UTILISATION THERAPEUTIQUE

(57) Abstract

Recombinant adenoviruses comprising a cassette which can be integrated into the genome of infected cells, the preparation thereof, pharmaceutical compositions containing same, and uses of said adenoviruses, are disclosed. The cassette particularly contains at least one inverted terminal repeat (ITR) of an AAV and a heterologous DNA sequence.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des adénovirus recombinants comportant une cassette capable de s'intégrer dans le génome des cellules infectées, leur préparation, les compositions pharmaceutiques les contenant, et leur utilisation. En particulier, la cassette contient au moins une séquence terminale inverse-répétée (ITR) d'AAV et une séquence d'ADN hétérologue.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

ADENOVIRUS RECOMBINANTS INTEGRATIFS, LEUR PREPARATION
ET LEUR UTILISATION THERAPEUTIQUE.

La présente invention concerne des vecteurs recombinants d'origine virale et leur utilisation thérapeutique. Plus particulièrement, elle concerne des adénovirus recombinants comportant une cassette capable de s'intégrer dans le génome des cellules infectées. L'invention concerne également la préparation de ces vecteurs, les compositions pharmaceutiques les contenant et leur utilisation pour le transfert de gènes in vitro, ex vivo et in vivo, notamment dans le cadre de thérapies génique et cellulaire.

La thérapie génique et cellulaire consiste à corriger une déficience ou une anomalie (mutation, expression aberrante, etc) ou à assurer l'expression d'une protéine d'intérêt thérapeutique par introduction d'une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit in vitro dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement in vivo dans le tissu approprié. Différentes techniques ont été décrites pour le transfert de cette information génétique, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), d'ADN et de polylysine, l'emploi de liposomes (Fraleigh et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc.

Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physicochimiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus. Toutefois, les vecteurs viraux développés jusqu'à présent ne permettent pas de résoudre de manière satisfaisante toutes les difficultés liées au transfert de gènes dans les cellules et/ou l'organisme. Ainsi, l'adénovirus, qui possède des propriétés attrayantes pour le transfert de gènes (possibilité de produire des titres élevés, faible pathogénicité) est un virus extrachromosomique. De ce fait, dans les cellules en division, le virus recombinant est dilué au cours des générations et finit par disparaître totalement des cellules filles. En revanche, alors que les vecteurs rétroviraux ou dérivés des virus adéno-associés (AAV) sont capables de s'intégrer dans le génome des cellules qu'ils

infectent, ils ne peuvent être produits en quantités élevées, ni par exemple incorporer des transgènes de taille importante.

La présente invention apporte une solution avantageuse à ces problèmes. La présente invention réside en effet dans la mise au point de vecteurs recombinants utilisables en thérapie génique, possédant les propriétés d'infection d'un vecteur adénovirus recombinant et permettant l'intégration d'une séquence hétérologue dans le génome de la cellule ou l'organe infectés.

Un premier objet de l'invention concerne plus particulièrement un adénovirus recombinant défectif comprenant une cassette capable de s'intégrer dans le génome des cellules infectées.

Généralement, la cassette comprend une séquence d'ADN désirée, le plus souvent hétérologue vis-à-vis de l'adénovirus, et des éléments permettant son intégration dans le génome des cellules infectées. De manière avantageuse, les éléments permettant l'intégration sont d'origine virale. Ainsi, les vecteurs de l'invention combinent des propriétés de deux types de virus : les adénovirus et les virus intégratifs.

Les vecteurs de l'invention sont particulièrement avantageux puisqu'ils peuvent être produits avec des titres élevés, ne sont pas pathogènes, possèdent un large spectre d'hôte, sont capables d'incorporer des séquences d'ADN hétérologue de taille importante, et d'intégrer lesdites séquences dans le génome des cellules infectées.

De plus, les vecteurs de l'invention permettent de limiter les risques de dissémination de la séquence d'ADN que l'on désire transférer à la cellule ou l'organisme. Une fois celle-ci intégrée dans le génome, elle ne peut plus être excisée et incorporée dans une particule virale infectieuse.

En outre, les vecteurs de l'invention permettent avantageusement de transférer aux cellules une séquence d'ADN totalement dépourvue de gènes viraux. En effet, la cassette permettant l'intégration dans le génome peut être totalement dépourvue de toute séquence codante d'origine virale. Les seules régions virales qui peuvent être introduites sont les éléments d'intégration.

Par ailleurs, selon la construction utilisée, les vecteurs de l'invention permettent une intégration de la séquence d'ADN hétérologue en un site précis du génome de la cellule infectée, et sans cytotoxicité.

Préférentiellement, les éléments permettant l'intégration de la cassette sont constitués par une ou plusieurs séquences terminales répétée-inversées. Encore plus

préférentiellement, les éléments permettant l'intégration de la cassette sont constitués par une ou plusieurs séquences terminales répétée-inversées d'un virus adéno-associé (AAV).

Un objet préféré de l'invention concerne donc un adénovirus recombinant
5 défectif comprenant une cassette contenant au moins une séquence terminale répétée-inversée d'AAV et une séquence d'ADN hétérologue.

La demanderesse a en effet montré que, de manière particulièrement
avantageuse, il est possible d'utiliser les propriétés d'intégration de l'AAV ("adeno-
10 associated virus") pour construire un vecteur viral selon l'invention, tel que défini ci-dessus.

Les AAV, comme les adénovirus, sont des virus pathogènes bénins des
voies aériennes. En l'absence de virus auxiliaire, les AAV possèdent la propriété de
s'intégrer de façon stable, sous forme d'un provirus, en un site préférentiel du
15 génome des cellules humaines (région du chromosome 19). Le génome des AAV a
été cloné, séquencé et caractérisé. Il comprend environ 4700 bases, et contient à
chaque extrémité une région terminale répétée-inversée (ITR) de 145 bases environ.
Le reste du génome est divisé en 2 régions essentielles portant les fonctions
d'encapsidation : la partie gauche du génome, qui contient le gène rep impliqué dans la
20 réplication virale et l'expression des gènes viraux; la partie droite du génome, qui
contient le gène cap codant pour les protéines de capside du virus.

Les régions terminales répétée-inversées (ITR) des AAV servent d'origine
de réplication pour le virus, et sont également responsables de l'intégration du virus
dans le génome des cellules infectées. Il a maintenant été montré qu'il est possible
25 d'introduire une ou plusieurs de ces ITRs sur un adénovirus recombinant pour cibler
l'intégration d'une séquence d'ADN hétérologue sur le chromosome d'une cellule
cible, et améliorer ainsi la stabilité d'expression dans le temps. La demanderesse a en
effet montré que ces séquences peuvent être introduites dans le génome d'un
adénovirus, qu'elles conservent leur fonctionnalité dans un contexte adénoviral, et
30 qu'elles peuvent être utilisées en thérapie génique ou cellulaire pour intégrer dans des
cellules humaines de façon stable une séquence introduite via un adénovirus. De
plus, ces virus hybrides de l'invention peuvent être préparés à des titres comparables
à ceux de l'adénovirus (très supérieurs à ceux obtenus avec l'AAV), permettant de
multiples applications thérapeutiques.

Dans un premier mode de réalisation, la cassette d'intégration selon l'invention ne comporte qu'une seule ITR d'AAV, liée à la séquence d'ADN hétérologue. Il a en effet été montré qu'une seule ITR d'AAV est suffisante pour induire l'intégration de la séquence hétérologue. Dans ce mode de réalisation, l'ITR peut être localisée en aval ou en amont de la séquence d'ADN hétérologue (figures 1a et 1b).

Avantageusement, l'adénovirus selon l'invention comprend une cassette contenant au moins une séquence d'ADN hétérologue bordée de deux ITR d'AAV (figure 1c). Ce mode de réalisation est particulièrement avantageux puisque l'efficacité d'intégration est très importante.

Comme indiqué ci-avant, le génome des AAV comprend 2 ITR, localisées à ses 2 extrémités : une ITR 5' localisée à l'extrémité gauche, et une ITR 3' localisée à l'extrémité droite. La séquence de ces ITR est identique, et elles sont orientées en sens inverse l'une de l'autre. Par ailleurs, dans certains cas, la structure des ITR peut être modifiée par des réarrangements, mais la composition en base n'est pas altérée. Pour la réalisation des vecteurs de l'invention, il est possible d'utiliser indifféremment une ou plusieurs de ces ITRs.

Dans un mode particulièrement avantageux de l'invention, la cassette comprend une séquence d'ADN hétérologue bordée d'une ITR 5' et d'une ITR 3' d'AAV.

Les ITR d'AAV peuvent être obtenues de différentes façons. Elles peuvent tout d'abord être isolées à partir du génome d'un AAV, par les techniques classiques de biologie moléculaire (voir notamment WO91/18088, WO93/09239). Comme indiqué ci-dessus, ces séquences possèdent environ 145 pb, sont localisées aux extrémités du génome de l'AAV, et peuvent être excisées au moyen d'enzymes de restriction appropriées. A cet égard, elles peuvent être isolées à partir des différents sérotypes d'AAV, tels que notamment les AAV1, AAV2, AAV3 et AAV4. Par ailleurs, la séquence des ITR étant connue, elles peuvent aussi être synthétisées artificiellement, au moyen de synthétiseurs d'acides nucléiques, ou obtenues par des techniques mixtes (isolement à partir du génome, puis élongation par des techniques de synthèse). Enfin, ces ITR peuvent également être modifiées par toute technique connue de l'homme du métier (biologie moléculaire, chimie, enzymologie, etc), dans

le but d'améliorer leur fonctionnalité, de réduire leur taille, d'augmenter leur stabilité après intégration ou leur spécificité d'intégration, etc. En particulier, elles peuvent être modifiées par mutation, délétion et/ou addition de paires de bases, selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

- 5 Avantageusement, dans les adénovirus de l'invention, la ou les ITR utilisées sont des ITR d'AAV-2.

Les ITR utilisées dans la présente invention peuvent comprendre uniquement les séquences nécessaires et suffisantes à l'intégration dans le génome des cellules (ITR stricte). Concernant les AAV, les ITR strictes correspondent aux 145 pb situées
10 de part et d'autre du génome (SEQ ID n° 4). Cependant, les ITR utilisées peuvent également comprendre des séquences supplémentaires, par exemple des séquences adjacentes du génome de l'AAV, et/ou des délétions, dans la mesure où ces séquences et/ou délétions ne suppriment pas la capacité d'intégration de la cassette. Ainsi, elles peuvent être isolées sous forme de fragments de longueur plus grande (par exemple
15 jusqu'à 1000 pb), qui peuvent être utilisés tels quels, s'ils ne suppriment pas la capacité d'intégration de la cassette, ou préalablement digérés pour réduire leur taille (voir par exemple SEQ ID n° 1-3 + 5).

Pour déterminer si la ou les séquences choisies peuvent permettre l'intégration dans le chromosome, il est par exemple possible de transfecter une lignée cellulaire
20 humaine (par exemple Hela ou 293) d'une part avec un plasmide portant un gène de sélection de type neoR entre les séquences à tester ou à côté de la séquence à tester et d'autre part avec un plasmide témoin portant le même gène de sélection sans lesdites séquences, de sélectionner des clones par ajout de l'antibiotique G418, puis de comparer entre les deux types de transfections le nombre de clones obtenus. La
25 fréquence d'intégration obtenue avec la ou les séquences test doit être supérieure à celle obtenue par simple sélection, pour que lesdites séquences soient utilisables.

Une autre manière de tester la capacité d'intégration des séquences est de transfecter la même lignée d'une part avec un plasmide portant un gène marqueur (ex. β gal) entre les séquences à tester et d'autre part avec un plasmide témoin portant
30 le même gène marqueur sans lesdites séquences, et de comparer au fur et à mesure des passages l'activité enzymatique entre les deux transfections; l'activité devant diminuer de façon exponentielle dans les transfections témoin et rester plus stable dans l'autre. A cet égard, les cellules "intégrantes" exprimant la β gal peuvent être repérées, après fixation, par coloration Xgal.

Quelle que soit la séquence de l'ITR utilisée, il est particulièrement avantageux qu'elle soit dépourvue de séquence virale codante. En effet, cela permet d'éviter d'introduire dans le génome des cellules des régions virales capables de coder pour tout ou partie de messagers ou protéines viraux, potentiellement toxiques ou immunogènes.

Pour la préparation des vecteurs de l'invention, il est donc particulièrement préféré d'utiliser une ou plusieurs ITR dépourvues de séquence virale codante.

Dans les cassettes de l'invention, la séquence d'ADN hétérologue et la ou les ITR doivent être agencées de manière à permettre l'intégration de la cassette dans le génome de la cellule infectée. Elles peuvent être soit directement jointes, soit espacées par des séquences n'altérant pas la propriété d'intégration de la cassette. En particulier, il peut s'agir d'un ou plusieurs sites de restriction, de régions issues d'un plasmide utilisé lors de la construction (exemple : plasmide bactérien), ou de toute région neutre, etc).

Comme indiqué ci-avant, les adénovirus de l'invention contiennent une cassette permettant l'intégration d'une séquence d'ADN hétérologue dans le génome de la cellule infectée. La séquence d'ADN hétérologue peut être toute séquence dont le transfert dans une cellule ou un organisme est désirée.

De manière avantageuse, la séquence d'ADN hétérologue contient un gène thérapeutique. Au sens de l'invention, on entend par gène thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit protéique ainsi codé peut être une protéine, un peptide, etc. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance (érythropoïétine, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, etc), les neurotransmetteurs
5 ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc; les apolipoprotéines : ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc (FR 93 05125), la dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les
10 gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase), etc.

Le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de
15 gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par exemple, être transcrites dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Les antisens comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321
20 201).

Le gène thérapeutique peut également comporter une ou plusieurs séquences codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre de l'invention, les adénovirus recombinants peuvent être utilisés pour la réalisation soit de vaccins soit
25 de traitements immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des microorganismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

30 En outre, avantageusement, la séquence d'ADN hétérologue peut comporter en plus du gène thérapeutique, un gène marqueur, tel que par exemple le gène de la β -galactosidase ou le gène néo. Les adénovirus de l'invention dans lesquels la cassette

comporte deux gènes (un gène thérapeutique et un gène marqueur notamment) sont particulièrement intéressants car leur construction est largement facilitée.

Préférentiellement, la séquence d'ADN hétérologue comprend également des séquences permettant l'expression du gène thérapeutique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou conférant au gène d'intérêt une spécificité d'expression tissulaire.

Par ailleurs, la séquence d'ADN hétérologue peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention sont des adénovirus incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la cassette. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande WO94/26914). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology

75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple].

5 De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101
10 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la cassette. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par
15 lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un
20 adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° WO94/26914 et FR 2,707,664 qui sont incorporées à la présente demande par référence.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.
25

Les adénovirus recombinants préparés selon la présente invention peuvent être utilisés pour le transfert de gènes d'intérêt in vitro, ex vivo ou in vivo. In vitro, ils peuvent permettre de transférer un gène à une lignée cellulaire, par exemple en vue de produire une protéine recombinante. Ex vivo, ils peuvent être utilisés pour
30 transférer un gène sur une population de cellules prélevée à partir d'un organisme, éventuellement sélectionnée et amplifiée, dans le but de conférer à ces cellules des propriétés désirées en vue de leur réadministration à un organisme. In vivo, ils peuvent être utilisés pour le transfert de gènes par administration directe d'une solution purifiée, éventuellement associée à un ou plusieurs véhicules
35 pharmaceutiques.

A cet égard, la présente invention concerne également toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits précédemment. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, 5 intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceu-tiquement acceptable pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, 10 permettent la constitution de solutés injectables.

Les doses d'adénovirus recombinant défectif utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus 15 recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les 20 techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

La présente invention offre ainsi un moyen très efficace pour le transfert de gènes dans les cellules. Les vecteurs de l'invention peuvent être utilisés dans de nombreuses applications, telles que les maladies génétiques (myopathie, 25 mucoviscidose, SCID, etc), les pathologies du système nerveux central (Alzheimer, Parkinson, etc), les maladies cardiovasculaires (hémophilie, athérosclérose), le SIDA, les cancers, etc.

Les vecteurs de l'invention sont tout particulièrement avantageux pour le transfert de gènes dans les cellules qui se divisent. En effet, grace aux capacités 30 d'infection du vecteur adénoviral et aux propriétés d'intégration de la cassette, les vecteurs de l'invention permettent de conférer à des cellules qui se divisent des propriétés stables au cours des générations. Des exemples préférés de ces types de cellules sont notamment les cellules hématopoiétiques (cellules souches, progéniteurs, etc), et les cellules cancéreuses. Tout particulièrement, les vecteurs de l'invention 35 peuvent être utilisés pour le transfert de gènes dans les cellules CD34.

A cet égard, l'invention concerne également toute cellule de mammifère modifiée par un adénovirus tel que défini précédemment. Plus préférentiellement, il s'agit d'une cellule humaine, et encore plus préférentiellement, choisie parmi les cellules hématopoïétiques, notamment CD34, ou tumorales.

5

En outre, les vecteurs de l'invention peuvent être utilisés aussi bien pour modifier des cellules humaines que animales (ovins, bovins, animaux domestiques (chiens, chats, etc), chevaux, poissons, etc).

10

L'invention fournit ainsi une méthode particulièrement efficace pour l'administration de gènes in vivo, comprenant l'administration d'un vecteur tel que défini ci-avant comprenant une cassette composée d'un gène et d'éléments permettant son intégration dans le génome de tout ou partie des cellules infectées.

15

Les adénovirus de l'invention comprenant une cassette constituée d'une séquence d'ADN hétérologue bordée de 2 ITR d'AAV peuvent également être utilisés pour la production d'AAV recombinants. Les AAV ont en effet besoin pour se répliquer de la présence d'un virus auxiliaire. Il peut s'agir en particulier d'un adénovirus d'un herpès virus ou d'un virus de la vaccine. En l'absence d'un tel virus

20

auxiliaire, les AAV restent sous forme latente dans le génome des cellules infectées, mais ne peuvent se répliquer. Pour cette raison, les AAV recombinants sont généralement produits par co-transfection dans une lignée cellulaire infectée par le virus auxiliaire (notamment l'adénovirus) d'un plasmide portant la cassette AAV (gène bordé des ITR) et d'un plasmide portant les gènes d'encapsidation (plasmide rep/cap).

25

Ce procédé implique trois partenaires = le virus auxiliaire, le plasmide AAV et le plasmide rep/cap. Grace à la présente invention, ce procédé peut être simplifié à 2 partenaires. En effet, les adénovirus de l'invention jouent à la fois le rôle de virus auxiliaire et de plasmide AAV. Ainsi, une autre application de l'invention réside dans un procédé de préparation d'AAV recombinants selon lequel les cellules productrices

30

sont infectées avec un adénovirus tel que décrit ci-avant et transfectées avec un plasmide portant les gènes rep et cap. Selon une variante de ce procédé, les gènes rep et cap sont également portés par un virus (notamment un adénovirus) utilisé pour co-infecter les cellules productrices. Cette variante est encore plus avantageuse puisqu'elle permet de remplacer l'étape de transfection du plasmide rep/cap par une

35

infection par un virus rep/cap, beaucoup plus efficace. Toujours selon une variante

préférée de mise en oeuvre, le procédé de l'invention fait appel à une lignée de production contenant, intégrés dans son génome, les gènes rep et cap. Dans cette variante, une seule étape d'infection avec le virus de l'invention est suffisante. Il est également possible d'utiliser un virus selon l'invention contenant, outre la cassette

5 ADN hétérologue/ITR d'AAV, une cassette d'expression des gènes rep et cap. Selon ce mode de réalisation, les gènes rep et cap peuvent être placés sous le contrôle d'un promoteur fort et/ou inductible. Avantagusement, l'adénovirus est délété de l'ensemble des gènes viraux à l'exception de la région E4, et il est co-infecté avec un

10 virus E4 utilisé est le même pour tous les ADN hétérologues. De plus, la construction du virus passe par l'intermédiaire d'un plasmide portant E4, la séquence PSI et les ITR de l'adénovirus (plasmide pE4ITR, cf FR 2,707,664), facilement manipulable, dans lequel sont introduits les gènes rep et cap et l'ADN hétérologue encadré des ITR

15 d'AAV. Cette stratégie permet ainsi de propager les 2 virus à toutes les cellules, contrairement à la transfection d'un plasmide rep- cap qui ne touche qu'une fraction de la population cellulaire et ne donne donc que des titres peu élevés d'AAV.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

20 Légende des figures

- Figure 1 : Représentation schématique des cassettes selon l'invention.
Figure 2 : Représentation du vecteur pXL2373
Figure 3 : Construction du vecteur pXL2373
Figure 4 : Représentation du vecteur pXL2384
- 25 Figure 5 : Construction du vecteur M13 ITR FL
Figure 6 : Représentation du vecteur pITRFL
Figure 7 : Représentation du vecteur pXL2388
Figure 8 : Représentation du vecteur pXL2389
Figure 9 : Représentation du vecteur papoAI ITRAAV

30 Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la

phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemples

Exemple 1 : Construction d'un plasmide portant le gène de la β -galactosidase inséré entre les ITRs de l'AAV2.

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur, désigné pXL2373, portant 2 régions ITRs encadrant un gène marqueur (β gal) et un site de polyadénylation, servant d'intermédiaire pour la préparation, par recombinaison, d'un adénovirus recombinant.

5

Le plasmide pXL2373 (figure 2) contient notamment un fragment comprenant
- le LTR ("long terminal repeat") du virus du sarcome de Rous (RSV),
- le gène lacZ d'*Escherichia coli* avec les séquences de localisation nucléaire,
et,

10

- les signaux de polyadénylation de la région précoce de SV40,
lequel fragment étant inséré entre deux séquences ITRs tronquées de l'AAV2. La séquence des ITR utilisées est représentée sur les SEQ ID n° 1 et 2.

Le vecteur pXL2373 contient également une région d'adénovirus permettant la recombinaison homologue.

15

Le vecteur pXL2373 a été construit de la manière suivante (figure 3) : Le fragment d'ADN portant le LTR ("long terminal repeat") du virus du sarcome de Rous (RSV), le gène lacZ d'*Escherichia coli* avec les séquences de localisation nucléaire et les signaux de polyadénylation de la région précoce de SV40 a été isolé
20 sous forme d'un fragment XbaI-KpnI à partir du plasmide pRSV- β gal (Stratford-Perricaudet et al., J.Clin.Invest.90 (1992) 626). Ce fragment a ensuite été inséré aux sites correspondant du plasmide pAICMVIXCAT.3 (Philip et al., Molecular and Cellular Biology, sous presse). Cette étape permet d'insérer ce fragment entre les 650 premières et les 191 dernières paires de bases (pb) de l'AAV2. Le plasmide résultant a
25 été appelé pXL2359 (figure 3a).

Le fragment XbaI-BglII de pXL2359, comportant le LTR du virus du sarcome de Rous (RSV), le gène lacZ d'*Escherichia coli* avec les séquences de localisation nucléaire et les signaux de polyadénylation de la région précoce de SV40, ainsi que les 191 dernières pb de l'AAV, a été inséré aux sites correspondants
30 de pBS KS+, pour générer le plasmide pXL2360. Ce sous-clonage permet d'isoler ce même fragment sous forme d'un fragment XbaI-SmaI. Le fragment XbaI-SmaI de pXL2360 a ensuite été inséré aux sites XbaI-EcoRV compatibles de pRSV- β gal pour donner le vecteur pXL2364 (figure 3a).

Le plasmide psub201 a été décrit dans Samulski et al. (J. Virol 61 (1987)
35 3096). Le fragment XbaI-PvuII de ce plasmide portant les séquences 4484 à 4675 de

l'AAV a été inséré aux sites XbaI-EcoRV de pCRII (Invitrogen) pour générer le plasmide pXL2362. Enfin le fragment SpeI-XbaI de pXL2362 a été introduit au site compatible XbaI de pXL2364 (figure 3b).

5 Le plasmide obtenu a été désigné pXL2373 (figure 2). La capacité de ce vecteur à permettre l'intégration de la cassette est vérifiée par transfection dans les lignées cellulaires Hela et 293.

Exemple 2 : Construction d'un plasmide portant le gène de la β -galactosidase inséré entre les ITRs de l'AAV2.

10

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur, désigné pXL2384, portant 2 régions ITRs encadrant un gène marqueur (β gal) et un site de polyadénylation, servant d'intermédiaire pour la préparation, par recombinaison, d'un adénovirus recombinant.

15

Le plasmide pXL2384 (figure 4) contient notamment un fragment comprenant
- le LTR ("long terminal repeat") du virus du sarcome de Rous (RSV),
- le gène lacZ d'Escherichia coli avec les séquences de localisation nucléaire,

et,

20

- les signaux de polyadénylation de la région précoce de SV40,
lequel fragment étant inséré entre deux séquences ITRs de l'AAV2. La séquence des ITR utilisées est représentée sur les SEQ ID n° 2 et 3.

Le vecteur pXL2384 contient également une région d'adénovirus permettant la recombinaison homologue.

25

Le vecteur pXL2384 a été obtenu en insérant les fragments

- EcoRV-XhoI de pRSV β gal portant la partie de la protéine IX de l'Ad5 servant à la recombinaison, et,

30 - EcoRV-KpnI de pXL2360 (exemple 1) portant la région 3' du gène lacZ à partir du site EcoRV, les signaux de polyadénylation de la région précoce de SV40, la région ITR de l'AAV plus les 47 pb situées en amont de l'ITR gauche de l'AAV2, aux sites XhoI-KpnI de pXL2373 (exemple 1).

Une carte de ce vecteur est donnée sur la figure 4. La capacité de ce vecteur à permettre l'intégration de la cassette est vérifiée par transfection dans les lignées cellulaires Hela et 293.

35

Exemple 3 : Construction d'un plasmide portant le gène de la β -galactosidase inséré entre les ITRs strictes de l'AAV2.

5 Dans les plasmides décrits ci-avant, les séquences ITRs utilisées comportent une extension de 46 pb en aval de l'ITR gauche ou en amont de l'ITR droite, et/ou une délétion de 9 pb en 5' de l'ITR gauche (voir SEQ ID n° 1-3). Cet exemple décrit la construction d'un plasmide comportant un gène d'intérêt inséré entre les ITRs strictes de l'AAV2. Plus particulièrement, cet exemple décrit la construction d'un

10 vecteur, désigné pITRFL, portant 2 régions ITRs strictes encadrant un gène marqueur (β gal) et un site de polyadénylation, servant d'intermédiaire pour la préparation, par recombinaison, d'un adénovirus recombinant.

Le plasmide pITRFL (figure 6) contient notamment un fragment comprenant

15 - le LTR ("long terminal repeat") du virus du sarcome de Rous (RSV),
 - le gène lacZ d'*Escherichia coli* avec les séquences de localisation nucléaire,
 et,
 - les signaux de polyadénylation de la région précoce de SV40,
 lequel fragment étant inséré entre deux séquences ITRs strictes de l'AAV2. La

20 séquence des ITR utilisées est représentée sur la SEQ ID n° 4.

Le vecteur pITRFL contient également une région d'adénovirus permettant la recombinaison homologue.

Le vecteur pITRFL a été construit de la façon suivante : La séquence ITR stricte a été construite au moyen des oligodéoxynucléotides suivants :

25

seq 4259: (SEQ ID n°6)

5' CTA GAT TGG CCA CTC CCT CTC TGC GCG CTC GCT CGC TCA
 CTG AGG CCG GGC GAC CAA AGG TCG CCC GAC GCC A 3'

seq 4260: (SEQ ID n°7)

30 5' AGC TTG GCG TCG GGC GAC CTT TGG TCG CCC GGC CTC AGT
 GAG CGA GCG AGC GCG CAG AGA GGG AGT GGC CAA 3'T

seq 4560: (SEQ ID n°8)

5' AGC TTG ACG CCC GGG CTT TGC CCG GGC GGC CTC AGT GAG
 CGA GCG A 3'

35

seq 4561: (SEQ ID n°9)

5' GCG CGC TCG CTC GCT CAC TGA GGC CGC CCG GGC AAA GCC
CGG GCG TCA 3'

seq 4263: (SEQ ID n°10)

5 5' GCG CGC AGA GAG GGA GTG GCC AAC TCC ATC ACT AGG GGT
TCC TAC TAG TG 3'

seq 4264: (SEQ ID n°11)

5' GAT CCA CTA GTA GGA ACC CCT AGT GAT GGA GTT GGC CAC
TCC CTC TCT 3'

10 Les oligodéoxynucléotides seq 4259 et seq 4260 sont hybridés et forment à leurs extrémités un demi-site XbaI et un demi-site HindIII (figure 5). Ces oligodéoxynucléotides sont ensuite introduits entre les sites correspondant de M13mp18, et le bactériophage obtenu est appelé M13ITR5' (figure 5). Les oligodéoxynucléotides seq 4560 et seq 4561 d'une part et seq 4263 et seq 4264
15 d'autre part sont hybridés deux à deux et introduits entre les sites HindIII et BamHI de M13mp18, le bactériophage obtenu est appelé M13ITR3'. Le fragment KpnI-AhaII de M13ITR5' comportant la région 5' de l'ITR d'AAV jusqu'au site AhaII (région 1 à 63 sur la séquence de l'AAV) et le fragment AhaII-BamHI comportant la région 3' de l'ITR (région 64 à 145) sont introduits aux sites KpnI-BamHI de
20 M13mp18 pour donner le vecteur M13 "ITRFL".

Le fragment BamHI-SpeI de M13 "ITRFL" contenant la séquence entière de l'ITR de l'AAV (bases 1 à 145) est introduite entre les sites uniques BglII-SpeI de pXL2384 pour donner le plasmide pRSVBgal ITR1ss.

Enfin les fragments KpnI-HincII de M13 "ITRFL" contenant la séquence entière de l'ITR de l'AAV (bases 1 à 145) et EcoRV-XhoI de pXL2384 portant la protéine IX de Ad5 sont introduits entre les sites compatibles XhoI-KpnI de pRSVBgalITR1ss pour donner pITRFL (figure 6).

30 Exemple 4 : Construction d'un plasmide portant le gène de la β -galactosidase et le gène néoR insérés entre les ITRs de l'AAV2.

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur, désigné pXL2388, portant 2 régions ITRs encadrant 2 gènes (Bgal et néoR) et un site de polyadénylation, servant d'intermédiaire pour la préparation, par recombinaison, d'un adénovirus recombinant.

Le plasmide pXL2388 (figure 7) contient notamment un fragment comprenant :

- le gène conférant la résistance à la néomycine (néoR) sous le contrôle du promoteur SV40, suivi des signaux de polyadénylation du virus SV40,
 - 5 - le LTR ("long terminal repeat") du virus du sarcome de Rous (RSV),
 - le gène lacZ d'*Escherichia coli* avec les séquences de localisation nucléaire, et,
 - les signaux de polyadénylation de la région précoce de SV40,
- lequel fragment étant inséré entre deux séquences ITRs de l'AAV2 (séquences représentées sur les SEQ ID n° 2 et 3).

10

Le vecteur pXL2388 contient également une région d'adénovirus permettant la recombinaison homologue.

Le vecteur pXL2388 a été construit de la manière suivante : Le fragment d'ADN portant le gène conférant la résistance à la néomycine (néoR) sous le contrôle du promoteur SV40, ainsi que les signaux de polyadénylation du virus SV40 a été isolé sous forme d'un fragment BamHI à partir du plasmide pMAMneoluc (Clontech). Ce fragment a ensuite été introduit au site BamHI du plasmide pBS KS+ (Stratagene) pour introduire des sites de restriction nouveaux de part et d'autre de ce fragment. Le plasmide ainsi obtenu est appelé pXL2363.

15

20

Le fragment d'ADN portant le gène conférant la résistance à la néomycine (néoR) sous le contrôle du promoteur SV40, ainsi que les signaux de polyadénylation du virus SV40 a ensuite été isolé à partir de pXL2363 sous forme d'un fragment EcoRI-XbaI et introduit aux sites EcoRI-XbaI de pCRII (Invitrogen) pour donner naissance au plasmide pXL2372.

25

Le fragment d'ADN portant le gène conférant la résistance à la néomycine (néoR) sous le contrôle du promoteur SV40, ainsi que les signaux de polyadénylation du virus SV40 a ensuite été isolé sous forme d'un fragment SpeI à partir de pXL2372, et introduit au site SpeI de pXL2384 (exemple 2) pour donner naissance au plasmide pXL2388 (figure 7). Un plasmide témoin, pXL2429, portant le gène de résistance à la néomycine sous le contrôle du promoteur SV40 et le gène lacZnlis sous le contrôle du promoteur RSV insérés entre les séquences de l'adénovirus, mais dépourvu des séquences ITR de l'AAV a également été construit. La séquence du gène de résistance à la néomycine sous le contrôle du promoteur SV40 provient du plasmide pXL2388

30

digéré par SpeI, et ce fragment a été inséré au site SpeI de pRSVGAIIX pour donner pXL2429.

5 La capacité de ce vecteur à permettre l'intégration de la cassette est vérifiée par transfection dans les lignées cellulaires Hela et 293. Les cellules 293 (2 10⁶ cellules cultivées en boîtes de 100 mm) sont transfectées avec les plasmides pXL2388, pXL2429 selon la technique au phosphate de calcium. Le lendemain de la transfection le milieu est changé. Après 72 heures les cellules sont récoltées et remises en culture après dilution au 1/10 et au 1/50 dans un milieu non sélectif. 72 heures après, le milieu
10 est changé et on applique un milieu sélectif contenant de la généticine à 400 microg/ml. Des clones apparaissent après environ 2 semaines de culture dans ce milieu et on constate que la fréquence d'apparition des clones est 100 fois plus élevée avec le plasmide pXL2388 qu'avec le plasmide pXL2429 ce qui témoigne de la capacité des ITRs à intégrer le transgène dans le génome de la cellule.

15

Exemple 5 : Construction d'un plasmide portant un gène de fusion Sh ble::lacZ inséré entre les ITRs de l'AAV2.

20 Cet exemple décrit la construction d'un vecteur, désigné pXL2389, portant 2 régions ITRs encadrant 1 gène de fusion (Sh ble::lacZ), servant d'intermédiaire pour la préparation, par recombinaison, d'un adénovirus recombinant.

25 Le plasmide pXL2389 (figure 8) contient notamment un fragment portant, sous le contrôle du promoteur SV40, une fusion entre le gène de la résistance à la Phléomycine (ou à la zéomycine) et le gène reporter lacZ, suivie des signaux de polyadénylation du virus SV40, lequel fragment étant inséré entre les séquences de deux ITRs de l'AAV (séquences représentées sur les SEQ ID n° 2 et 3).

30 Le vecteur pXL2389 contient également une région d'adénovirus permettant la recombinaison homologue. La fusion portant un marqueur dominant (Sh ble) et le gène reporter lacZ permet d'obtenir un phénotype dominant associé à un phénotype rapidement identifiable (coloration bleue sur X-gal) avec une taille qui n'excède pas 3.5 kb. De ce fait la région insérée entre les deux ITRs de l'AAV a une taille qui n'excède pas 4.3 kb.

Le vecteur pXL2389 a été construit de la façon suivante : Le fragment SpeI-NdeI du plasmide pUT593 (Cayla, Toulouse) portant le promoteur SV40 et le début de la fusion Sh ble::lacZ a été isolé, puis inséré entre les sites SpeI-NdeI de pXL2384 (exemple 2). Le plasmide ainsi obtenu a été désigné pXL2389 (figure 8). La capacité
5 de ce vecteur à permettre l'intégration de la cassette est vérifiée par transfection dans les lignées cellulaires Hela et 293.

Exemple 6 : Construction d'un plasmide portant le gène de l'apolipoprotéine AI inséré entre les ITRs de l'AAV2.

10

L'apolipoprotéine AI est une protéine constituée de 243 acides aminés, synthétisée sous la forme d'une prépropeptide de 267 résidus, ayant une masse moléculaire de 28.000 daltons. Elle est synthétisée chez l'homme spécifiquement dans le foie et l'intestin et elle constitue la protéine essentielle des particules HDL
15 (70% de leur masse en protéines). Elle est abondante dans le plasma (1.0-1.2 g/l). Son activité la mieux caractérisée sur le plan biochimique est l'activation de la lécithine-cholestérol acyl-transférase (LCAT), mais de nombreuses autres activités lui sont attribuées, comme notamment la stimulation de l'efflux de cholestérol cellulaire. Le rôle physiologique de l'apolipoprotéine AI semble contrebalancé par
20 l'apolipoprotéine AII puisque chez l'homme, le rapport des deux concentrations plasmatiques (AII/AI) est très étroitement corrélé avec le risque coronarien. L'apolipoprotéine AI joue un rôle majeur dans la résistance à l'athérosclérose, probablement lié au transport inverse du cholestérol, puisque la seule expression de cette apolipoprotéine dans des souris transgéniques permet de réduire de 40 fois la
25 surface des dépôts lipidiques au niveau de l'aorte par rapport à des souris contrôles (Rubin et al. 1993 Science, In Press). Son gène, long de 1863 bp, a été cloné et séquencé (Sharpe et al., Nucleic Acids Res. 12(9) (1984) 3917). Par ailleurs, différents variants naturels de l'apoAI ont décrits dans l'art antérieur.

Les plasmides utilisés pour générer, par recombinaison homologe, les
30 adénovirus recombinants exprimant le gène de l'apoAI ont été construits comme suit :

Construction du plasmide papoAI ITR AAV (figure 9) :

Le plasmide papoAI ITR AAV contient notamment l'ADNc codant pour la préproapoAI sous le contrôle du promoteur RSV, les signaux de polyadénylation du virus SV40 , le tout inséré entre les ITRs de l'AAV, ainsi qu'une région d'adénovirus
35 permettant la recombinaison homologe. Il a été construit de la manière suivante : Le

fragment d'ADN portant notamment l'ITR gauche et la séquence d'encapsulation de l'adenovirus 5 ainsi que le LTR du virus RSV a été isolé sous forme d'un fragment XmnI-ClaI du plasmide pXL2384 (exemple 2) et le fragment d'ADN portant l'ADNc codant pour la préproapoAI et les signaux de polyadénylation du virus SV40 a été isolé sous forme d'un fragment ClaI-BamHI à partir du plasmide pXL2244 (FR93 05125). Ces deux fragments ont ensuite été insérés aux sites XmnI-BamHI du plasmide pXL2384, pour générer le plasmide papoAI ITR AAV. Lors de cette dernière étape, la région lacZ suivie du polyA de SV40 a été éliminée.

La capacité de ce vecteur à permettre l'intégration de la cassette est vérifiée par transfection dans les lignées cellulaires Hela et 293.

Exemple 7 : Construction du plasmide pXL2629.

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur pXL2629 portant 2 régions ITRs encadrant le gène marqueur lacZ et un site de polyadénylation, servant d'intermédiaire pour la préparation par recombinaison d'un adénovirus recombinant. Ce plasmide diffère du plasmide pXL2384 par la séquence de l'ITR AAV gauche (SEQ ID n°5). Le plasmide pXL2359 (exemple 1) a été digéré par HinfI dont l'extrémité a été rendue franche par un traitement par l'ADN polymérase du bactériophage T4 puis redigéré par PstI, un fragment d'environ 200 pb portant l'ITR de l'AAV (séquence figure) a été isolé et introduit dans le plasmide pBSKS+ aux sites PstI et SmaI (extrémité franche). Le plasmide ainsi construit est pXL2580.

Le plasmide pXL2581 est dérivé de pXL2384 par insertion de 2 oligonucléotides seq 4674 et seq 4675 aux sites BglII-SpeI de pXL2384, ce plasmide porte donc à la place de l'ITR de l'AAV gauche de pXL2384 un site unique BstBI qui pourrait être utilisé pour construire des adénovirus recombinants AdITRsAAVRSVBgal par la technique de transfection d'un mélange de ligation de deux plasmides linéarisés dans les cellules 293.

seq4674 : 5'GATCTTTTCGAAT3' (SEQ ID n°12)
seq 4675 : 5'CTAGATTCGAAA3' (SEQ ID n°13)

Le plasmide pXL2629 a été construit de la façon suivante : le plasmide pXL2580 a été digéré par BamHI-BglII et le fragment d'environ 170 pb contenant la séquence complète de l'ITR de l'AAV a été introduit dans le plasmide pXL2581 préalablement linéarisé par BglII.

Exemple 8 : Préparation de l'adénovirus Ad ITRsAAVRSV β Gal

Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant déficient comportant une cassette permettant l'intégration d'un gène dans le génome des
5 cellules. Plus particulièrement, cet adénovirus, désigné Ad ITRsAAVRSV β Gal comporte une cassette composée de 2 ITR d'AAV entourant le gène β gal. Cet adénovirus a été obtenu par cotransfection du plasmide pXL2384 pour la recombinaison avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en trans les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B)
10 d'adénovirus.

Plus précisément, l'adénovirus Ad ITRsAAVRSV β gal a été préparé par recombinaison homologue in vivo entre l'adénovirus AdRSV β Gal (Stratford-Perricaudet et al., J.Clin.Invest. 90 (1992) 626) et le plasmide pXL2384 selon le
15 protocole suivant : Le plasmide pXL2384 linéarisé par l'enzyme XmnI et l'adénovirus AdRSV β Gal linéarisé par ClaI sont cotransfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium pour permettre la recombinaison. Les adénovirus recombinants ainsi générés sont sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus déficient recombinant non purifié ayant un
20 titre d'environ 10^{10} pfu/ml. Pour la purification, les particules virales sont centrifugées sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456).

L'adénovirus Ad ITRsAAVRSV β gal est conservé à -80°C dans 20% de
25 glycérol.

Exemple 9 : Préparation de l'adénovirus Ad Δ ITRsAAVRSV β gal.

Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant déficient comportant une cassette permettant l'intégration d'un gène dans le génome des
30 cellules. Plus particulièrement, cet adénovirus, désigné Ad Δ ITRsAAVRSV β Gal comporte une cassette composée de 2 ITR d'AAV tronquées entourant le gène β gal. Cet adénovirus a été obtenu par cotransfection du plasmide pXL2373 pour la recombinaison avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en trans les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B)
35 d'adénovirus.

Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans l'exemple 7 pour la préparation de l'adénovirus Ad ITRsAAVRSV β gal. L'adénovirus Ad Δ ITRsAAVRSV β gal est conservé à -80°C dans 20% de glycérol.

5 Exemple 10 : Préparation de l'adénovirus Ad ITRFL.

Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant défectif comportant une cassette permettant l'intégration d'un gène dans le génome des cellules. Plus particulièrement, cet adénovirus, désigné Ad ITRFL comporte une
10 cassette composée de 2 ITR strictes d'AAV entourant le gène β gal. Cet adénovirus a été obtenu par cotransfection du plasmide pITRFL pour la recombinaison avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en trans les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans l'exemple 7 pour la
15 préparation de l'adénovirus Ad ITRsAAVRSV β gal. L'adénovirus Ad ITRFL est conservé à -80°C dans 20% de glycérol.

Exemple 11 : Préparation de l'adénovirus Ad apoAI ITRAAV.

Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant défectif comportant une cassette permettant l'intégration d'un gène dans le génome des cellules. Plus particulièrement, cet adénovirus, désigné Ad apoAI ITRAAV comporte une cassette composée de 2 ITR d'AAV tronquées entourant le gène de la préproapoAI. Cet adénovirus a été obtenu par cotransfection du plasmide papoAI
20 ITR AAV pour la recombinaison avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en trans les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans l'exemple 8 pour la
préparation de l'adénovirus Ad ITRsAAVRSV β gal. L'adénovirus Ad apoAI ITRAAV
30 est conservé à -80°C dans 20% de glycérol.

Exemple 12 : Préparation de l'adénovirus Ad2629.

- Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant Ad2629 portant une cassette composée de 2 ITRs d'AAV entourant le gène Bgal. Cet
- 5 adénovirus a été obtenu par cotransfection du plasmide pXL2629 avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en trans les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.
- Plus précisément les adénovirus Ad2629 ont été préparés par recombinaison
- homologue in vivo entre l'adénovirus d1324 et le plasmide pXL2629 selon le
- 10 protocole suivant : le plasmide pXL2629 linéarisé par XmnI et l'adénovirus d1324 linéarisé par ClaI sont cotransfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium pour permettre la recombinaison. Les adénovirus recombinants ainsi générés
- sont sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant
- 15 de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10⁹-10¹⁰ pfu/ml. Pour la purification, les particules virales sont centrifugées sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973)456).

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

- 5 (i) DEPOSANT:
(A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
(B) RUE: 20; avenue Raymond ARON
(C) VILLE: ANTONY
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 92165
- 10 (ii) TITRE DE L' INVENTION: : VIRUS RECOMBINANTS, LEUR PREPARATION
ET LEUR UTILISATION THERAPEUTIQUE.
- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 13
- (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:
(A) TYPE DE SUPPORT: Tape
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
15 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

- 20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 135 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
- 25 (ix) CARACTERISTIQUE :
(D) AUTRE INFORMATION: /product= Séquence ITR droite sur
pXL2373
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CCATGGCTAC GTAGATAAGT AGCATGGCGG GTTAATCATT AACTACAAGG AACCCCTAGT 60
30 GATGGAGTTG GCCACTCCCT CTCTGCGCGC TCGCTCGCTC ACTGAGGCCG GGCGACCAAA 120
GGTCGCCCCG CGCCC 135

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

- 35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 174 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
- 40 (ix) CARACTERISTIQUE :
(D) AUTRE INFORMATION: /product= Séquence ITR gauche sur
pXL2384 et sur pXL2373
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:
- GGCGGCTCGC TCGCTCACTG AGGCCGCCCG GGCAAAGCCC GGGCGTCGGG CGACCTTTGG 60

TCGCCCCGGCC TCAGTGAGCG AGCGAGCGCG CAGAGAGGGA GTGGCCAACT CCATCACTAG 120
GGGTTCCTTG TAGTTAATGA TTAACCCGCC ATGCTACTTA TCTACGTAGC CATG 174

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 192 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(ix) CARACTERISTIQUE :
(D) AUTRE INFORMATION: /product= Séquence ITR droite sur
pXL2384

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

15 CCATGGCTAC GTAGATAAGT AGCATGGCGG GTTAATCATT AACTACAAGG AACCCTAGT 60
GATGGAGTTG GCCACTCCCT CTCTGCGCGC TCGCTCGCTC ACTGAGGCCG GGCGACCAAA 120
GGTCGCCCCG CGCCCGGGCT TTGCCCGGGC GGCCTCACTG AGCGAGCGAG CGCGCAGAGA 180
GGGAGTGGCC AA 192

20 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 145 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(ix) CARACTERISTIQUE :
(D) AUTRE INFORMATION: /product= Séquence ITR stricte

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

30 TTGGCCACTC CCTCTCTGCG CGCTCGCTCG CTCACTGAGG CCGGGCGACC AAAGGTCGCC 60
CGACGCCCCG GCTTTGCCCC GCGGCGCTCA GTGAGCGAGC GAGCGCGCAG AGAGGGAGTG 120
GCCAACTCCA TCACTAGGGG TTCCT 145

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

- 35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 194 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 40 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(ix) CARACTERISTIQUE :
(D) AUTRE INFORMATION: /product= ITR AAV gauche de pXL2629

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

AGATCTGGGC CACTCCCTCT CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGGG CGACCAAAGG 60
TCGCCCCGACG CCCGGGCTTT GCGCGGGCGG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG 120
GAGTGGCAAC TCCATCACTA GGGGTTCTTG GAGGGGTGGA GGGGGGATCC ACTAGTTCTA 180
5 GAACTAGTGG ATCC 194

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

- 10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 73 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
15 (ix) CARACTERISTIQUE :
(D) AUTRE INFORMATION: /product= Seq 4259

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CTAGATTGGC CACTCCCTCT CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGGG CGACCAAAGG 60
TCGCCCCGACG CCA 73

20 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 73 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
25 (C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(ix) CARACTERISTIQUE :
(D) AUTRE INFORMATION: /product= Seq 4260

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

30 AGCTTGGCGT CGGGCGACCT TTGGTCGCCC GGCTCAGTG AGCGAGCGAG CGCGCAGAGA 60
GGGAGTGGCC AAT 73

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

- 35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 46 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
40 (ix) CARACTERISTIQUE :
(D) AUTRE INFORMATION: /product= Seq 4560

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

AGCTTGACGC CCGGGCTTTG CCCGGGCGGC CTCAGTGAGC GAGCGA

46

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 48 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(ix) CARACTERISTIQUE :
(D) AUTRE INFORMATION: /product= Seq 4561
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:
GCGCGCTCGC TCGCTCACTG AGGCCGCCCC GGCAAAGCCC GGGCGTCA

48

15 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 50 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 20 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(ix) CARACTERISTIQUE :
(D) AUTRE INFORMATION: /product= Seq 4263
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:
25 GCGCGCAGAG AGGGAGTGGC CAACTCCATC ACTAGGGGTT CCTACTAGTG

50

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

- 30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 48 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
35 (ix) CARACTERISTIQUE :
(D) AUTRE INFORMATION: /product= Seq 4264
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:
GATCCACTAG TAGGAACCCC TAGTGATGGA GTTGCCACT CCCTCTCT

48

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

- 40 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 12 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE :

(D) AUTRE INFORMATION: /product= Seq 4674

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

GATCTTTCGA AT

12

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 12 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE :

(D) AUTRE INFORMATION: /product= Seq 4675

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

CTAGATTCGA AA

12

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif comprenant une cassette capable de s'intégrer dans le génome des cellules infectées.
2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la cassette
5 comprend une séquence d'ADN hétérologue et des éléments permettant son intégration dans le génome.
3. Adénovirus selon la revendication 2 caractérisé en ce que les éléments permettant l'intégration de la cassette sont d'origine virale.
4. Adénovirus selon la revendication 3 caractérisé en ce que la cassette
10 contient au moins une séquence terminale inverse-répétée (ITR) d'AAV et une séquence d'ADN hétérologue.
5. Adénovirus selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'ITR d'AAV est localisée en aval ou en amont de la séquence d'ADN hétérologue.
6. Adénovirus selon la revendication 4 caractérisé en ce que la cassette
15 contient au moins une séquence d'ADN hétérologue bordée de deux ITR d'AAV.
7. Adénovirus selon l'une des revendications 4-6 caractérisé en ce que la ou les ITR sont des ITR strictes ou possédant des régions supplémentaires ou des délétions ne supprimant pas la capacité d'intégration.
8. Adénovirus selon l'une des revendications 3 à 7 caractérisé en ce que la ou
20 les ITR sont des ITR d'AAV-2.
9. Adénovirus selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue comprend un gène thérapeutique.
10. Adénovirus selon la revendication 11 caractérisé en ce que le gène
25 thérapeutique est un gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique, un gène codant pour un ou plusieurs peptides antigéniques, ou un gène ou une séquence antisens.

11. Adénovirus selon la revendication 10 caractérisé en ce que le gène thérapeutique code pour un produit protéique choisi parmi les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, les facteurs de croissance (érythropoïétine, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, etc), les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc; les apolipoprotéines : ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc, la dystrophine ou une minidystrophine, la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, les facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase).

12. Adénovirus selon l'une des revendications 9 à 11 caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue comprend un gène thérapeutique sous le contrôle d'un promoteur.

13. Adénovirus selon la revendication 12 caractérisé en ce que le promoteur est un promoteur constitutif, régulé et/ou tissu-spécifique.

14. Adénovirus selon la revendication 13 caractérisé en ce que le promoteur est un promoteur viral.

15. Adénovirus selon la revendication 14 caractérisé en ce que le promoteur est choisi parmi les promoteurs E1A, MLP, CMV et LTR-RSV.

16. Adénovirus selon la revendication 12 caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue comprend également, entre le gène thérapeutique et le promoteur, une séquence de sécrétion.

17. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue comprend un gène thérapeutique et un gène marqueur, de préférence le gène de la β -galactosidase.

18. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il est dépourvu au moins des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible.

19. Adénovirus selon la revendication 18 caractérisé en ce qu'il sagit d'un adénovirus humain de type Ad5 ou Ad2 ou canin de type CAV-2.

20. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 19.

5 21. Composition pharmaceutique selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.

22. Composition pharmaceutique selon la revendication 20 ou 21 caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml adénovirus recombinants défectifs.

10 23. Cellule de mammifère caractérisée en ce qu'elle est modifiée par un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 19.

24. Cellule selon la revendication 23 caractérisée en ce qu'il sagit d'une cellule humaine.

15 25. Cellule selon la revendication 24 caractérisée en ce qu'il sagit d'une cellule hématopoïétique, notamment CD34, ou tumorale.

26. Utilisation d'un adénovirus selon la revendication 6 pour la production d'AAV recombinants.

20 27. Utilisation selon la revendication 26 caractérisé en ce que les cellules productrices sont infectées par un adénovirus selon la revendication 6 et transfectées par un plasmide portant les gènes rep et cap.

28. Utilisation selon la revendication 26 caractérisé en ce que les cellules productrices sont co-infectées par un adénovirus selon la revendication 6 et par un adénovirus portant les gènes rep et cap.

25 29. Utilisation selon la revendication 26 caractérisé en ce que les cellules productrices contiennent les gènes rep et cap intégrés dans leur génome et sont infectées par un adénovirus selon la revendication 6.

30. Utilisation selon les revendications 26-29 caractérisé en ce que les cellules productrices sont les cellules 293.

31. Adénovirus selon la revendication 6 caractérisé en ce qu'il contient en outre une cassette d'expression des gènes rep et cap.

32. Adénovirus selon la revendication 31 caractérisé en ce qu'il est dépourvu de l'ensemble des gènes viraux à l'exception de la région E4.

1/10

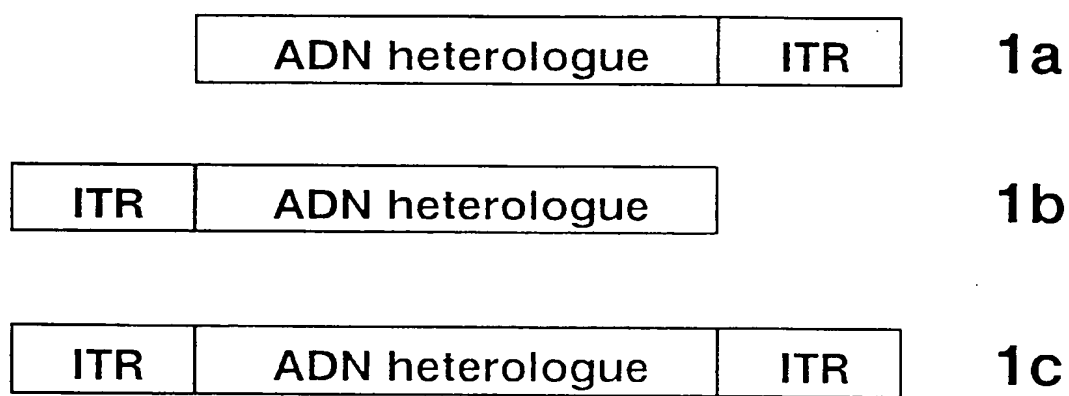


Figure 1

2/10

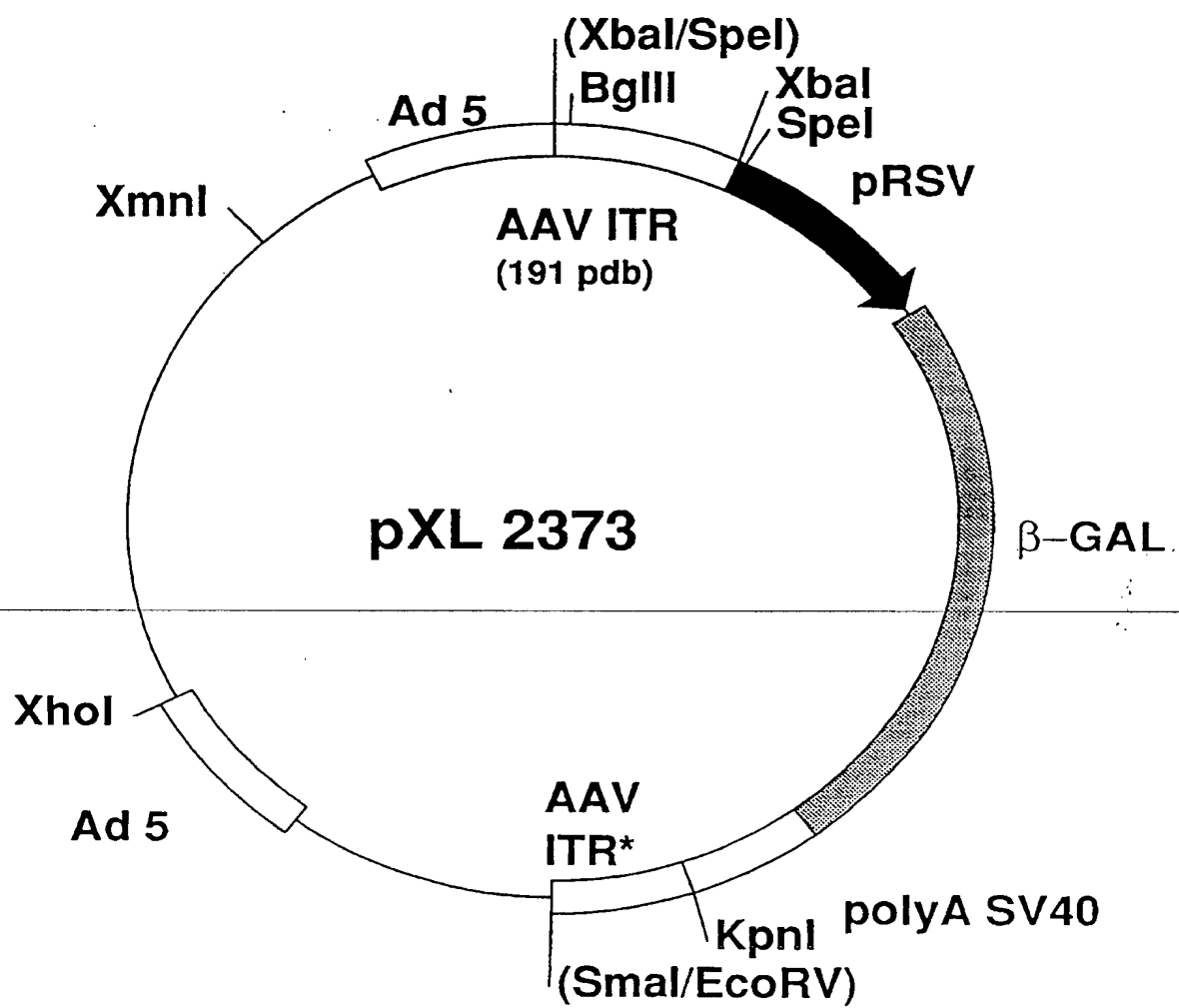


Figure 2

3/10

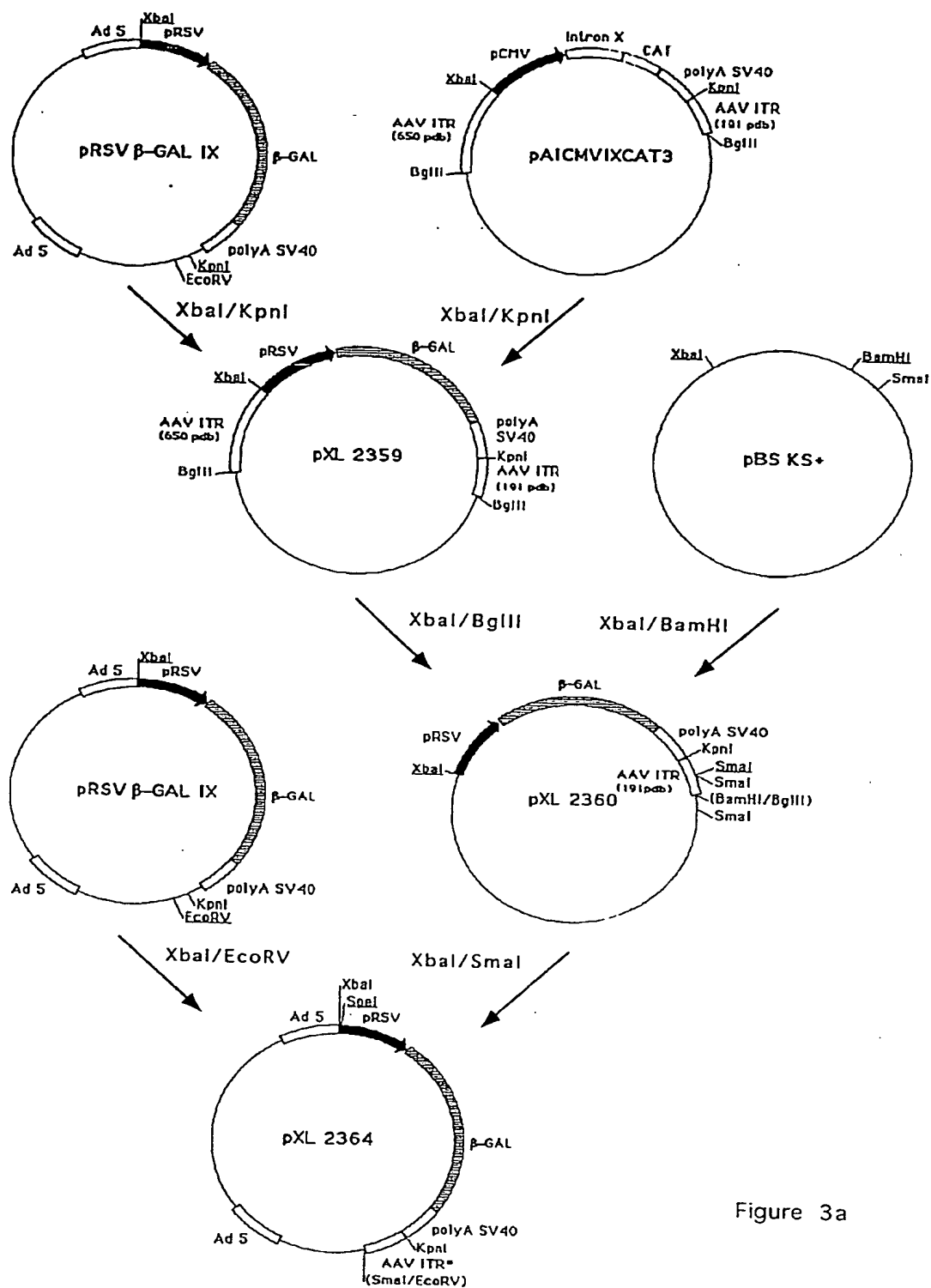


Figure 3a

4/10

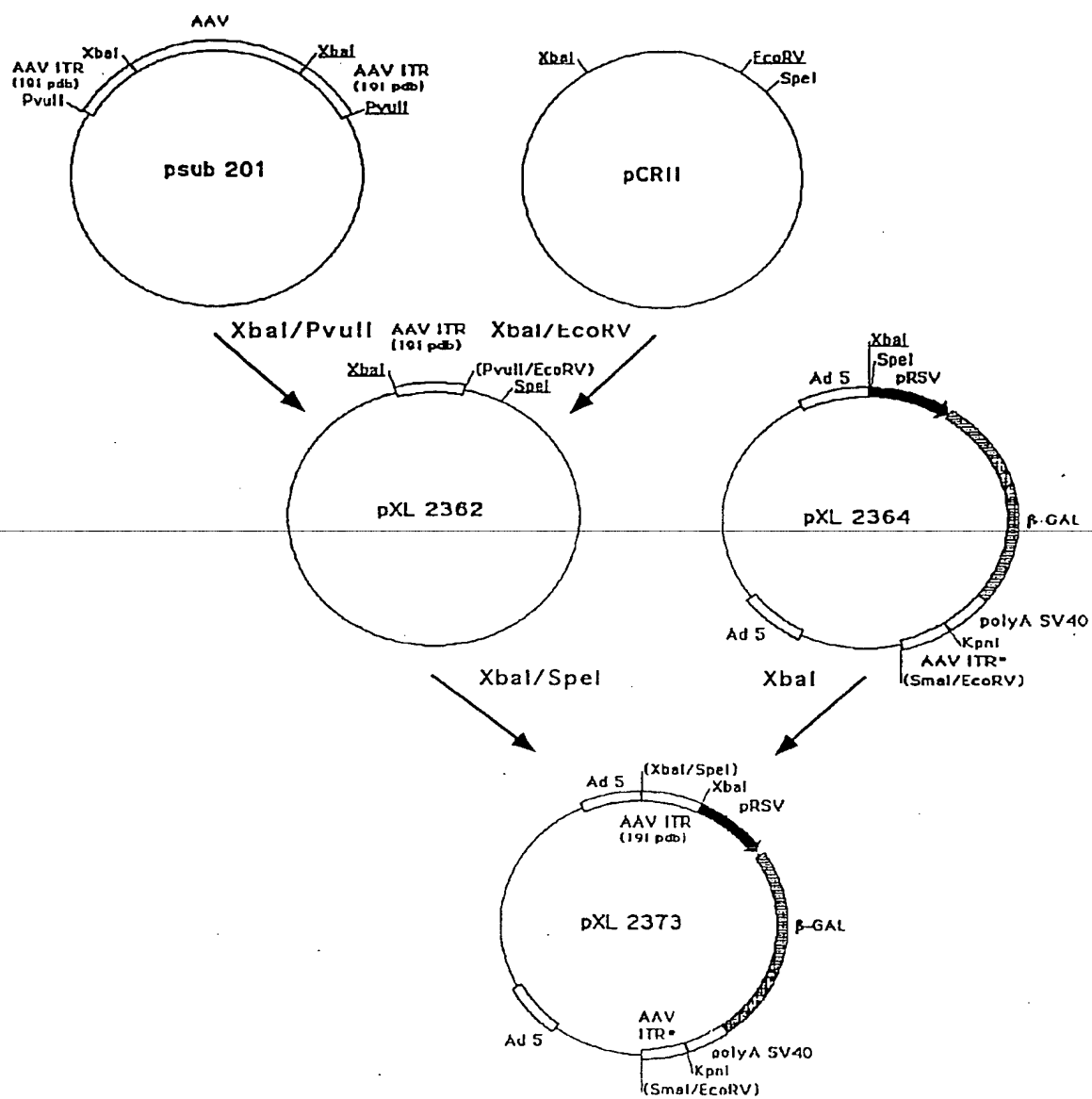


Figure 3b

5/10

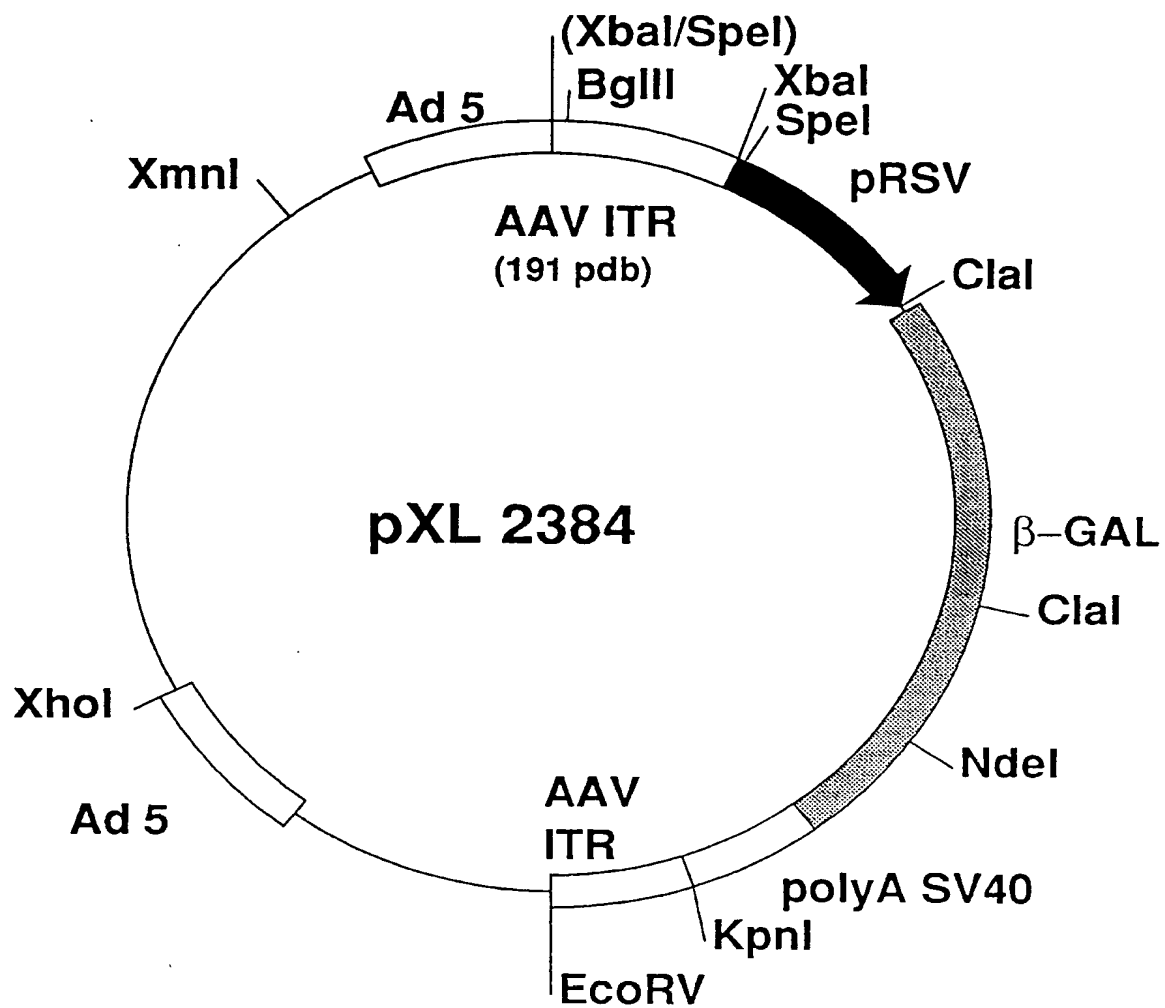


Figure 4

6/10

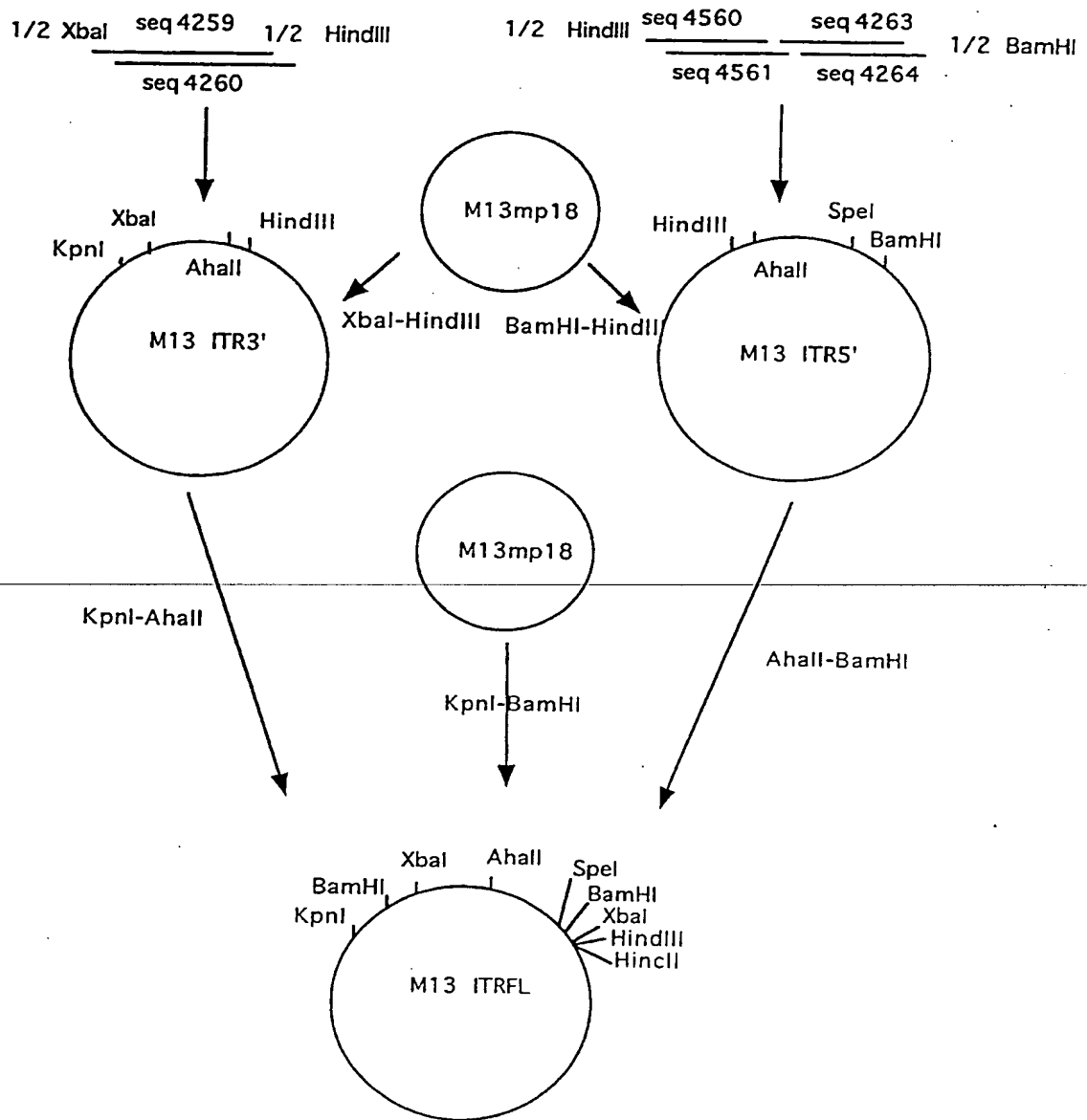


Figure 5

7/10

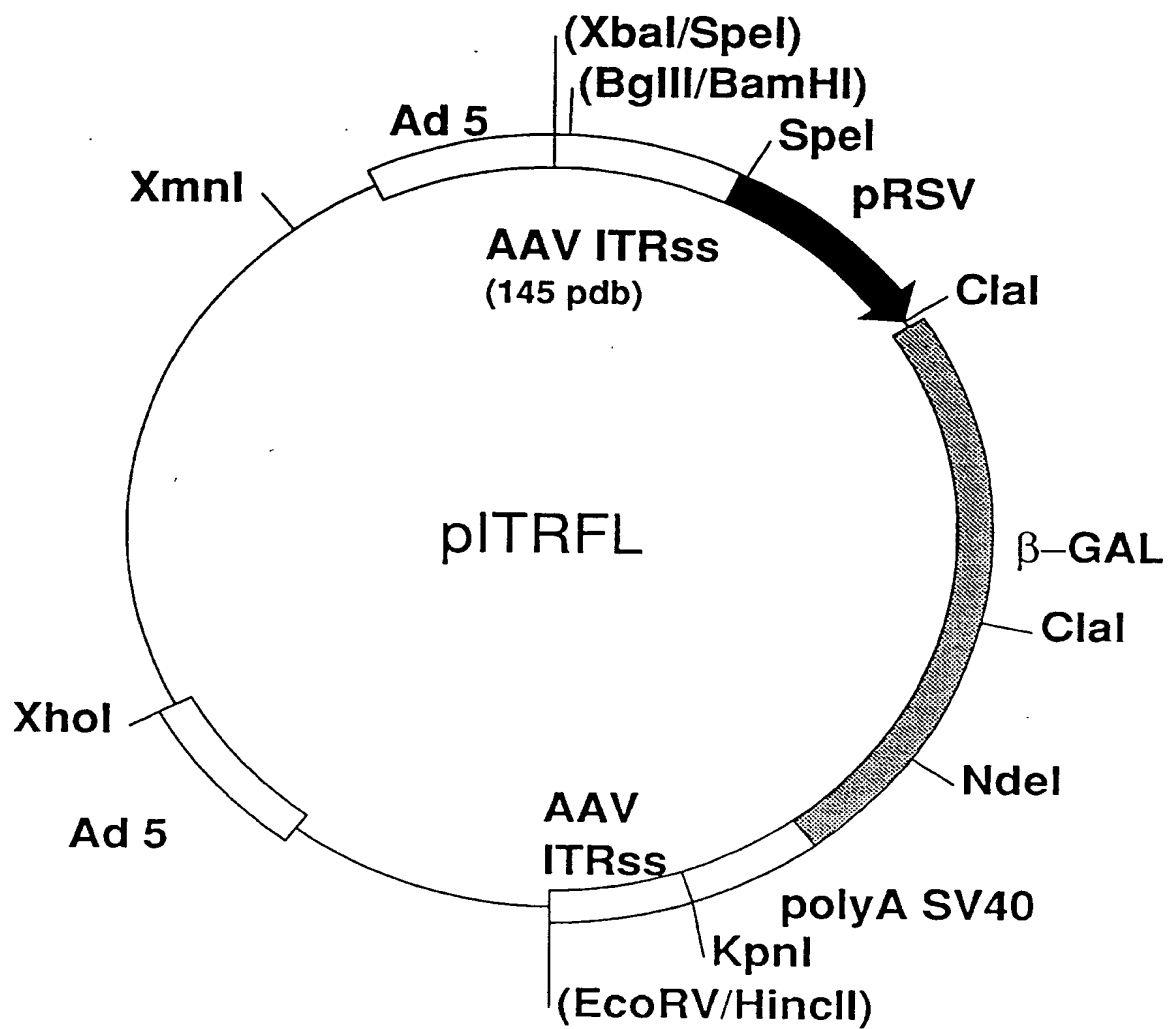


Figure 6

8/10

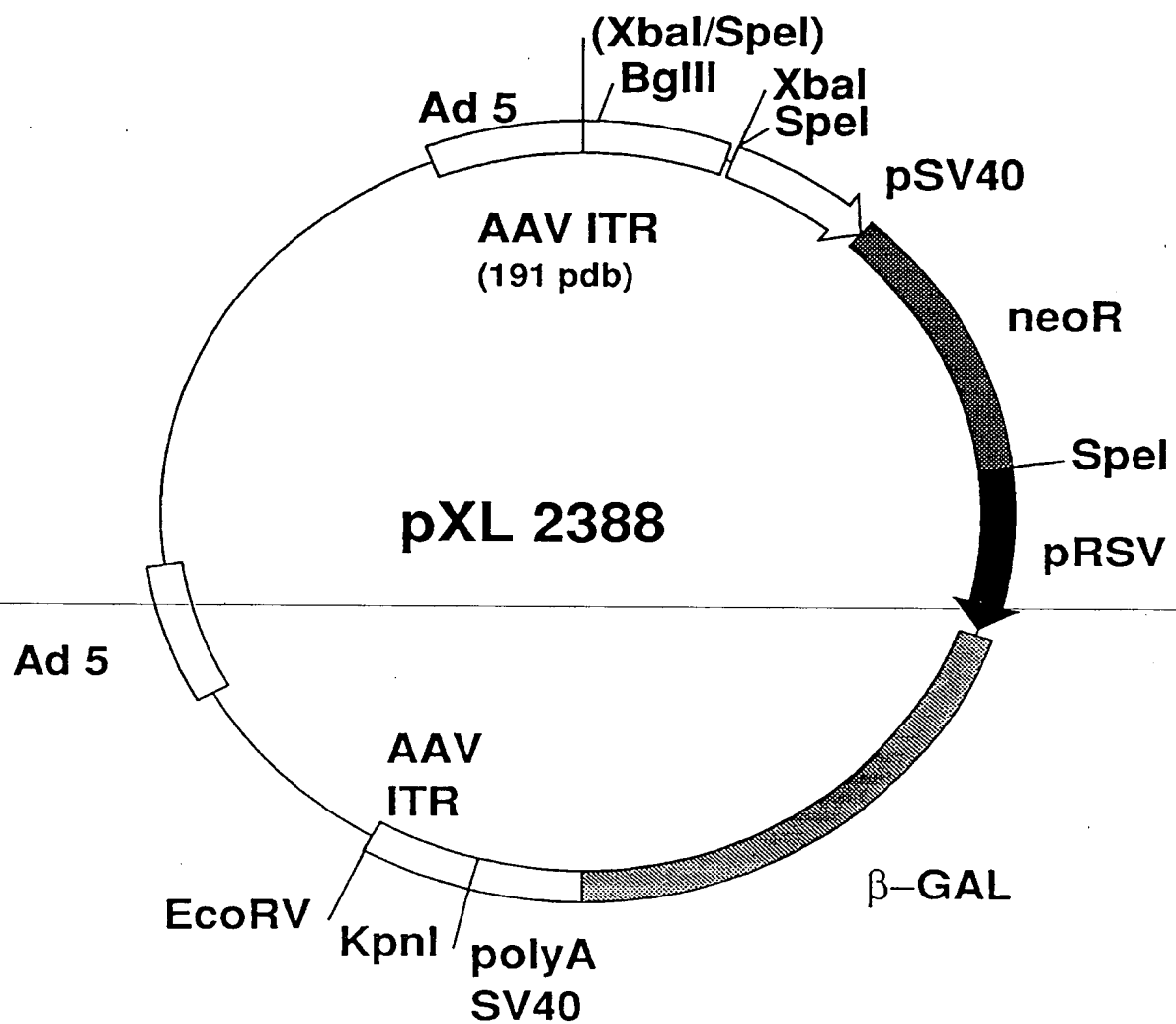


Figure 7

9/10

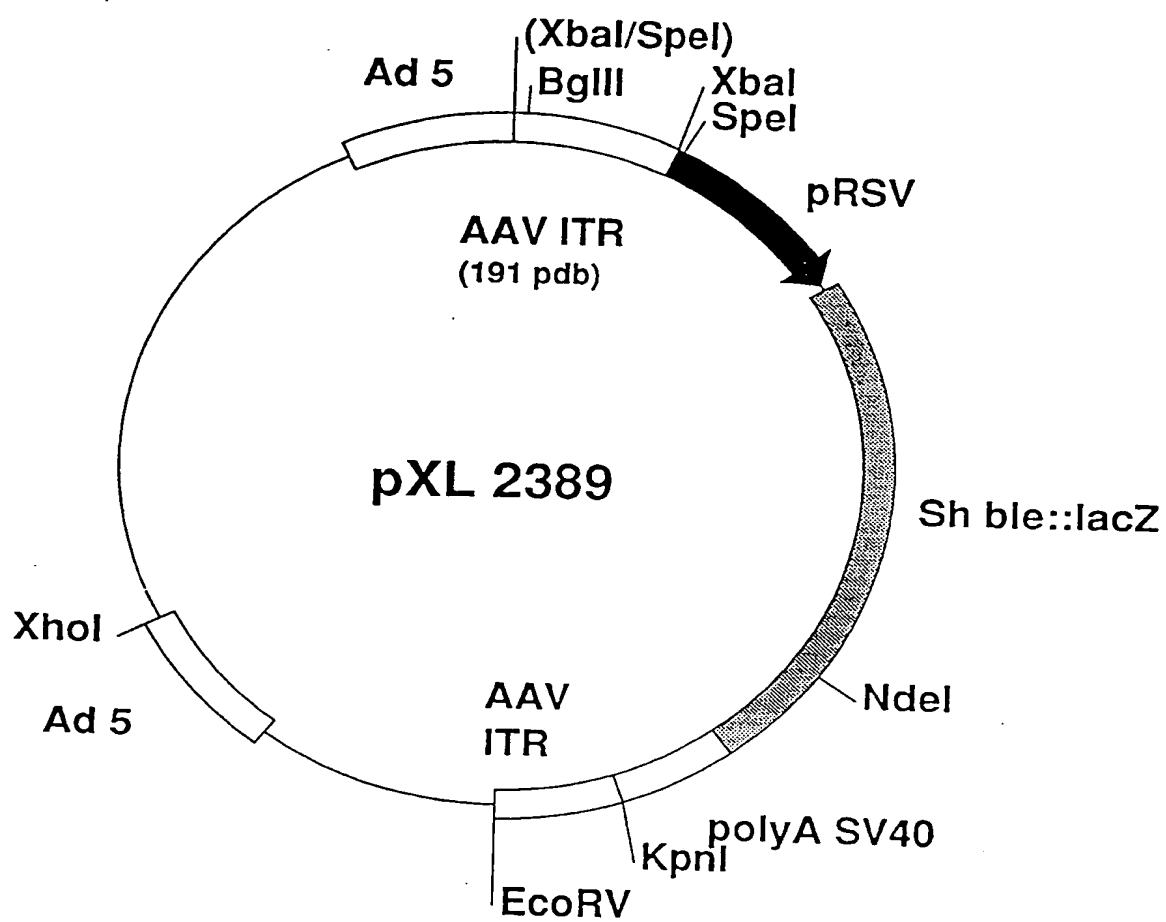


Figure 8

10/10

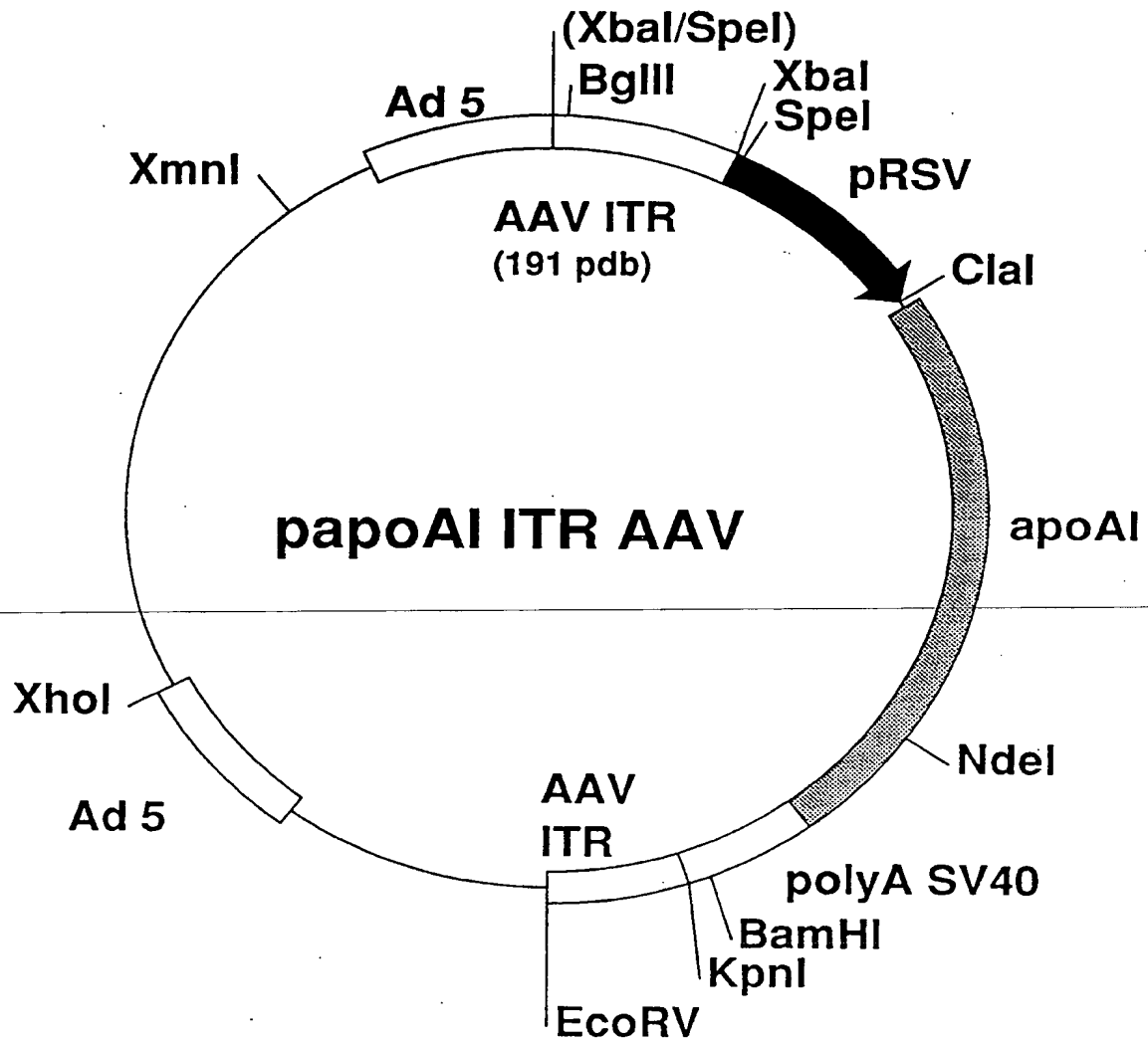


Figure 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/TR 95/00233

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N7/01 A61K39/235 C12N5/10
C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GENE., vol.119, no.2, 1992, AMSTERDAM NL pages 265 - 272 NAHREINI, P. ET AL. 'Cloning and integration of DNA fragments in human cells via the inverted terminal repeats of the adeno-associated virus 2 genome' see the whole document ---	1
P,A	EP,A,0 592 836 (AMERICAN CYANAMID COMPANY) 20 April 1994 see the whole document ---	1
A	WO,A,93 09239 (RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGY) 13 May 1993 see claims 1-3,7,9,15-17,20 ---	1,26
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 May 1995

Date of mailing of the international search report

31.05.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

PCT/IR 95/00233

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/TR 95/00233

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0592836	20-04-94	CA-A- 2106260	18-03-94
WO-A-9309239	13-05-93	US-A- 5252479	12-10-93
		AU-B- 657829	23-03-95
		AU-A- 3134093	07-06-93
		EP-A- 0566732	27-10-93
		JP-T- 6504680	02-06-94
		PT-A- 101040	31-05-94
EP-A-0488528	03-06-92	US-A- 5173414	22-12-92
		CA-A- 2054517	01-05-92
		JP-A- 5308975	22-11-93
		US-A- 5354678	11-10-94
WO-A-9324641	09-12-93	AU-B- 4598193	30-12-93
		CA-A- 2136441	09-12-93
		EP-A- 0644944	29-03-95

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/00233

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N7/01 A61K39/235 C12N5/10 C12N15/12		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N A61K C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	GENE., vol.119, no.2, 1992, AMSTERDAM NL pages 265 - 272 NAHREINI, P. ET AL. 'Cloning and integration of DNA fragments in human cells via the inverted terminal repeats of the adeno-associated virus 2 genome' voir le document en entier ---	1
P,A	EP,A,0 592 836 (AMERICAN CYANAMID COMPANY) 20 Avril 1994 voir le document en entier ---	1
A	WO,A,93 09239 (RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGY) 13 Mai 1993 voir revendications 1-3,7,9,15-17,20 --- -/--	1,26
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
* Catégories spéciales de documents cités: <div style="display: flex;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">19 Mai 1995</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">31-05-1995</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Chambonnet, F</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/00233

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP,A,0 488 528 (APPLIED IMMUNOSCIENCES) 3 Juin 1992 voir le document en entier ---	26
A	WO,A,93 24641 (UNITED STATES OF AMERICA: DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 9 Décembre 1993 voir le document en entier -----	26

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux numéros de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/TR 95/00233

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP-A-0592836	20-04-94	CA-A-	2106260	18-03-94

WO-A-9309239	13-05-93	US-A-	5252479	12-10-93
		AU-B-	657829	23-03-95
		AU-A-	3134093	07-06-93
		EP-A-	0566732	27-10-93
		JP-T-	6504680	02-06-94
		PT-A-	101040	31-05-94

EP-A-0488528	03-06-92	US-A-	5173414	22-12-92
		CA-A-	2054517	01-05-92
		JP-A-	5308975	22-11-93
		US-A-	5354678	11-10-94

WO-A-9324641	09-12-93	AU-B-	4598193	30-12-93
		CA-A-	2136441	09-12-93
		EP-A-	0644944	29-03-95

2000

Identification of the Arg-Gly-Asp sequence in laminin A chain as a latent cell-binding site being exposed in fragment P1

Monique Aumailley, Martin Gerl, Arnoud Sonnenberg*, Rainer Deutzmann° and Rupert Timpl

*Max-Planck-Institut für Biochemie, D-8033 Martinsried, FRG, *Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service and Laboratory for Experimental and Clinical Immunology, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands and °Department of Biochemistry, Microbiology and Genetics, University of Regensburg, Regensburg, FRG*

Received 2 January 1990

A single RGD-containing sequence present within an epidermal growth factor-like repeat of the short arms of laminin is shown by peptide inhibition to block integrin receptors recognizing a latent cell-binding site of laminin. Based on proteolysis data it is proposed that masking occurs by folding of the globular domain IVa over the cell-binding site in the adjacent rod-like structures of laminin A chain.

Basement membrane; Cell attachment; Integrin; Proteolytic fragment; Synthetic peptide

1. INTRODUCTION

Fragment P1 generated from laminin by pepsin treatment was the first domain of the protein shown to be involved in cellular interactions [1,2]. Various cells have been found which bind fragment P1 with high affinity ($K_D \sim 1\text{--}4\text{ nM}$) to an apparently homogenous class of receptors [3–5]. It was later shown that this binding site is latent both within laminin and within a larger P1-related fragment produced by cleavage with elastase [6]. The P1 fragment (about 200 kDa) comprises the inner rod-like structure of the short arms of laminin and contains some 28 EGF-like repeats contributed by the A, B1 and B2 chains of laminin [7–9]. Its A chain segment also possesses the only RGD (Arg-Gly-Asp) sequence present in mouse laminin [9]. Similar sequences are involved in cell binding to several other proteins including fibronectin, vitronectin and collagens [10]. Here, we show by peptide and antibody inhibition and by proteolytic inactivation that the laminin RGD sequence very likely corresponds to the latent cell-binding site identified previously [6], and is recognized by cellular receptors of the integrin family.

2. EXPERIMENTAL

The mouse EHS tumor laminin-nidogen complex [11] and its large tryptic fragment T1 [12] were prepared as previously described. Both

Correspondence address: M. Aumailley, Max-Planck-Institut für Biochemie, D-8033 Martinsried, FRG

Abbreviations: EGF, epidermal growth factor; EHS, Engelbreth-Holm-Swarm tumor; HPLC, high performance liquid chromatography; TLCK, tosyl lysyl chloromethane

components were cleaved in 0.1 M glycine-HCl, pH 1.9 with pepsin (24 h, 25°C, enzyme-substrate ratio 1:100) to generate fragment P1 which was then purified on a molecular sieve [12]. Some small peptides in the pepsin digest were bound to heparin-Sepharose (Pharmacia) equilibrated in 0.1 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4 and eluted with 0.5 M NaCl. This material was separated into 25 distinct peaks by reversed phase HPLC and individual peptides were identified by Edman degradation [13]. Trypsin inactivation of P1 some synthetic peptides was performed at 37°C in 0.2 M NH_4HCO_3 (enzyme-substrate ratio 1:100) and the reaction was stopped by adding TLCK. Laminin fragment P1 was also isolated from human placenta [14]. Human-plasma fibronectin (Behringwerke) was further purified on heparin-Sepharose. Synthetic peptides GRGDS (Promega) and RGDs (Peninsula) were from commercial sources. Other RGD-containing peptides (see fig. 1) were synthesized according to sequences of mouse [9] and human [15] laminin A chain, mouse laminin B1 chain [16] and mouse nidogen [17] and kindly supplied by Drs J. Knolle, S. Henke (Hoechst AG) and W. Stüber (Behringwerke). They were purified by HPLC and their structure was confirmed by Edman degradation.

Cell attachment was determined in microtiter wells coated with optimal substrate concentrations and adherent cells were analyzed after staining with Crystal violet by a colorimetric assay [18]. In the inhibition assays cells ($1\text{--}5 \times 10^5/\text{ml}$) were mixed with synthetic peptides ($1\text{--}500\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$) or various antibody dilutions and plated for 30 min at 37°C on coated microtiter wells. Cultured cell lines are identified in table 1 and were those used in previous studies [5,18,19]. A monoclonal rat antibody against the $\alpha 6$ subunit of integrin VLA-6 [20] and a rabbit antiserum against human fibronectin receptor [21] were used for inhibition. The latter was a kind gift from Dr G. Tarone (University of Torino).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Examination of the adhesion of ten different cell lines (table 1) to laminin fragment P1 showed typical dose-response profiles [5,18] with 30–80% of the cells bound in the plateau region. Comparable attachment profiles were observed for fibronectin and, with two exceptions (A375, SCIII), for the laminin-nidogen com-

Table 1

Inhibitory capacity (IC_{50} = 50% inhibition) of GRGDS peptide for cell adhesion on laminin fragment P1 and fibronectin (Fn)

Cell lines		IC_{50} (μ g/ml) on	
		P1	Fn
HT1080, fibrosarcoma	H	< 10	500
SAOS-2, osteosarcoma	H	< 10	> 500
A375, melanoma	H	< 10	nt
HBL100, mammary epithelia	H	< 10	> 500
RN22, Schwannoma	R	< 10	> 500
B16F10, melanoma	M	< 10	nt
A431, epidermoid	H	100	200
SCII, epithelial Ca	H	> 500	nt
SCIII, epithelial Ca	H	320	nt
Rugli, glioblastoma	R	50	250

H, human; R, rat; M, mouse; Ca, carcinoma; nt, not tested

plex. Three more teratocarcinoma cell lines (mouse F9, PYS-2, human Tera-2) showed strong attachment on fibronectin but none on fragment P1 substrates. This indicates the unique nature of the P1 substrate whose cellular recognition is not necessarily correlated to that of laminin and fibronectin.

Adhesion of six cell lines to fragment P1 could be clearly inhibited by less than 10 μ g/ml (20 μ M) required for 50% inhibition (fig.1a) of synthetic GRGDS peptide (table 1) which corresponds to fibronectin cell-binding sequence [10]. About 20–50 times higher peptide concentrations were needed to achieve this inhibition for the other four cell lines. This low sensitivity for GRGDS inhibition was generally observed when the same cells were exposed to fibronectin substrates (table 1). Peptide GRGDS (10–500 μ g/ml) was completely inactive in inhibiting adhesion of HT1080, SAOS-2 and B16F10 cells to laminin or laminin-nidogen (data not shown). This is in agreement with the previous observation [6] that the P1 binding site is not recognized by HT1080 cells in intact laminin.

Specificity of peptide inhibition of cell adhesion to fragment P1 was studied by using the variant RGE sequence which was inactive up to 500 μ g/ml for HT1080 (fig.1a), B16F10 and SAOS-2 cells. Similar observations have been reported for fibronectin [22], collagen type VI [18] and several other cell adhesion substrates. Also, no inhibitory activity for HT1080 (fig.1a) and A375 cells was found for the synthetic CDPGYIGSR-amide peptide which was designed according to a B1 chain sequence [16] present in fragment P1. This peptide has been reported [23] to block cell adhesion to laminin by binding to a 68 kDa receptor.

The RGD-containing sequence of laminin A chain [9] was synthesized as the 18-mer oligopeptide CQAGTFALRGDNPQGCSF-amide and used in cyclic, disulfide-linked and linear, alkylated forms for inhibition. Both peptides were of equivalent inhibitory capacity when compared with GRGDS on a molar basis for cells

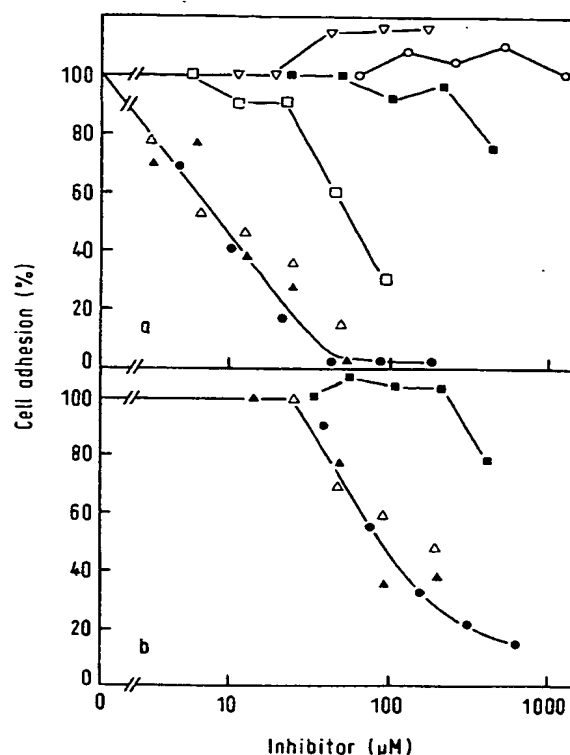


Fig.1. Peptide inhibition of attachment of HT1080 cells (a) and of A431 cells (b) on a laminin fragment P1 substrate. Inhibitors used were GRGDS (●), RGE (○), CQAGTFALRGDNPQGCSF-amide corresponding to a mouse laminin A chain sequence which was used either in cyclic, disulfide-linked (Δ) or linear, S-carboxyamided from (▲), GDVEKRGDREEA from a human laminin A chain sequence (■) SIGFRGDGQT from a mouse nidogen sequence (□), and CDPGYIGSR-amide (▽) from a mouse laminin B1 chain sequence.

highly sensitive to peptide inhibition as shown for HT-1080 cells (fig.1a). Similar studies with cells where GRGDS is of low inhibitor potency against P1 also showed no better inhibitory activity for the authentic laminin peptides (fig.1b). This indicates a small binding sequence, unlike that indicated by observations with fibronectin [22,24] where larger peptides were the better inhibitors. It also indicates that the disulfide-bonded loop structure supposed to exist in the EGF-like repeats of laminin [25] is not important for activity. Another RGD sequence is found in the C-terminal globule of human laminin A chain [15] which is changed in mouse laminin [9] to AGG. A synthetic peptide corresponding to the human sequence GDVEKRGDREEA was found to be of very low inhibitory potency for cell adhesion to fragment P1 (fig.1). A somewhat better activity was observed for the peptide SIGFRGDGQT which corresponds to a sequence in mouse nidogen possibly involved in cell adhesion [17]. This suggests that amino acid residues adjacent to the RGD sequence determine its inhibitory activity in the P1 adhesion assay.

Whether the active RGD sequence as shown here is conserved in laminin A chain of other species or in isoforms [8] of the chain is so far not known. We have therefore used laminin fragment P1 prepared from pepsin digests of human placenta [14] in cell adhesion assays. Four cell lines (A375, A431, HBL-100, SAOS-2) showed attachment up to 60–100% of the plateau levels achieved with mouse laminin P1. The attachment of A375 cells to human laminin P1 could be inhibited by GRGDS with a similar sensitivity when compared to a mouse laminin P1 substrate (data not shown). It indicates conservation of this particular RGD sequence in laminin of human and possibly other species.

The latent nature of the P1 cell-binding site was previously shown in radioligand assays with HT-1080 cells [6]. We now examined the general nature of this masking effect by using a tryptic laminin fragment T1 which is larger than fragment P1 [12] and was an inactive adhesion substrate for the cell lines listed in table 1. Progressive pepsin treatment of fragment T1 led to increased attachment activity reaching eventually the levels of authentic P1 (fig.2a). After exposure by pepsin treatment this RGD sequence becomes sensitive to trypsin, which reduces cell attachment activity to negligible levels (fig.2b). In agreement with this, trypsin treatment for 4 h reduced the inhibitory capacity of the cyclic 18-mer RGD-peptide of laminin (see above) to less than 5% (not shown).

A structural explanation of these observations is proposed in fig.3, indicating that the EGF-like repeats present in the rod-like domains IIIa and IIIb in laminin A chain are connected to each other by a disulfide bond despite their separation in the primary sequence [9] by a 196-residue globular domain IVa, lacking cysteine residues. This would predict folding of IVa over adjacent portions of IIIa/IIIb, making the RGD sequence in intact laminin and fragment T1 inaccessible to cellular receptors and trypsin. There are several facts supporting this prediction. The EGF-like repeats of IIIa/IIIb bordering the IVa sequence are both incomplete, but nevertheless complement each other to a full length repeat with 8 cysteine residues which should [25] bring domains IIIa and IIIb in close proximity (fig.3). Unmasking of the RGD could then occur by extensive cleavage within domain IVa by pepsin without separating the link between domains IIIa and IIIb. This is supported by our sequence analysis of various small peptides obtained from pepsin digests of laminin-nidogen identifying two peptides with either 12 or 13 residues which both share the N-terminal sequence IKGG starting at position 1243 in domain IVa (fig.3). It has been also observed that fragment T1 or similar adhesion-inactive fragments still possess globular domains of the short arms [22] which are no longer visible by electron microscopy after pepsin treatment [7,26]. Yet, the rods in fragment P1 still have a length of

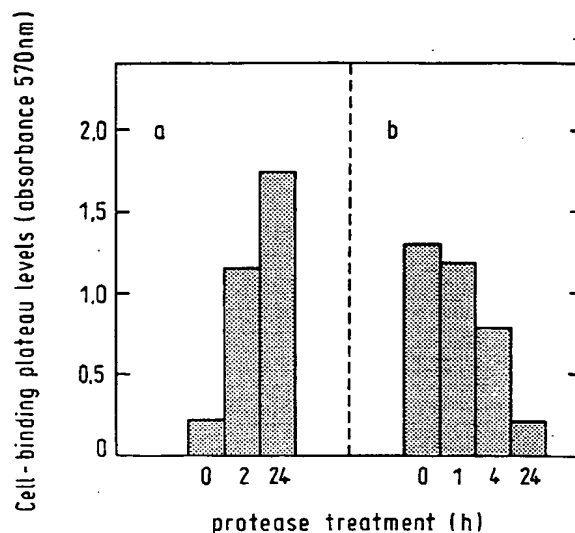


Fig.2. Activation (a) and inactivation (b) of the cell-binding structure in laminin fragment P1 by protease treatment for the indicated periods of time. In (a) the tryptic laminin fragment T1 was treated with pepsin and in (b) the pepsin fragment P1 was treated with trypsin. Cell-binding properties of starting materials (0 h) and of digested materials were then determined with A375 cells by constructing dose-response attachment profiles using a colorimetric assay [18]. Plateau levels of attachment are indicated by the bars.

26–37 nm while a 10–12 nm long rod [9,25] would have to be observed if pepsin cleavage separates domains IIIa and IIIb.

Recognition of RGD sequences in some adhesive proteins is due to cellular receptors of the integrin type [10,27]. To examine this possibility for the P1 substrate we used an antiserum against human fibronectin recep-

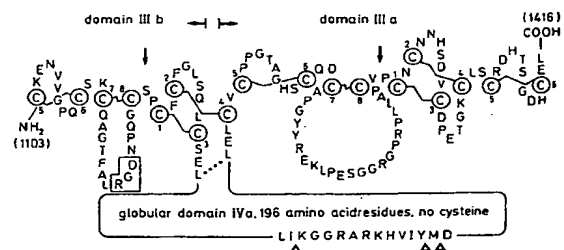


Fig.3. Model of the possible disulfide bond junction between two incomplete EGF-like repeats in domains IIIa and IIIb of mouse laminin A chain to explain masking of the RGD cell-binding site by folding of the inserted domain IVa over adjacent regions in IIIa and IIIb. The model shows part of the amino acid sequence between positions 1103–1416 of the A chain [9] with cysteine encircled. Numbering of the eight cysteines and disulfide bonding pattern (C1–C3, C2–C4, C5–C6, C7–C8) is indicated as predicted [25] from the similarity to EGF. Borders of the predicted EGF-like repeat contributed by IIIa and IIIb are marked by arrows. A normal size of the loop in the postulated EGF-like repeat actually occupied by domain IVa is indicated by dots. The RGD sequence is boxed. Arrowheads in the domain IVa sequence mark identified pepsin cleavage sites.

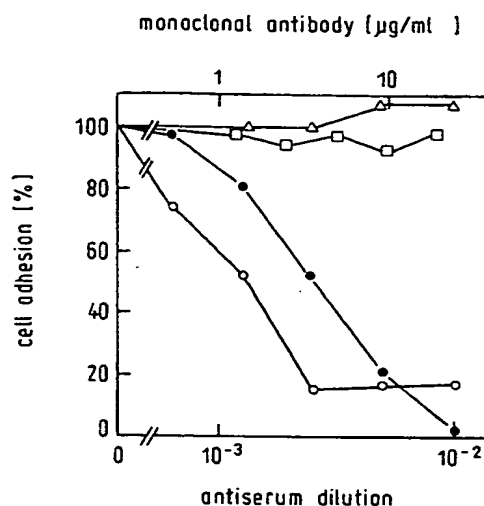


Fig.4. Inhibition of attachment of HT1080 cells (full symbols) or A431 cells (open symbols) on a fragment P1 substrate by anti-receptor antibodies. Inhibitors were rabbit antiserum against human fibronectin receptor (O,●), a purified rat monoclonal antibody against the $\alpha 6$ subunit of integrin VLA-6 (□) and for control normal rabbit serum (Δ).

tor [21] which was previously shown to react with both its $\beta 1$ and $\alpha 5$ subunits. This antiserum showed complete and specific blocking of P1 adhesion of two cell lines (fig.4) which differ considerably in their sensitivity to inhibition by GRGDS peptide (table 1). A monoclonal antibody (GoH3) specific for the $\alpha 6$ subunit of integrins was previously found to inhibit platelet adhesion to laminin [20]. This antibody was incapable of preventing cell adhesion to laminin fragment P1 (fig.4) when tested in a concentration range completely blocking cell adhesion of the same HT1080 cells to laminin or its major cell-binding fragment E8 [19]. These data indicate that cell adhesion to fragment P1 is mediated by integrin receptors but since the $\beta 1$ subunit is shared by several integrins [10,27] it does not suggest the exclusive involvement of the fibronectin receptor.

Our data provide evidence that the single RGD sequence present in the A chain component of laminin fragment P1 is involved in a latent cell-binding site with binding activity for integrin receptors. While apparently recognized by a large variety of cells it may not represent the only cell-binding site in P1 since the sequence YIGSR was also found to be active [23] and to prevent metastasis [28]. Mitogenic activity [29] and stimulation of pheochromocytoma PC12 cells (G. Tarone, personal communication) shared by laminin and its fragment P1 are insensitive to RGD and YIGSR peptide inhibition and therefore appear not to be masked indicating further independent cell-binding sites. The latent nature of the RGD binding site in fragment P1 raises the question on its biological relevance, which would necessitate proteolytic activation in situ, for example, during base-

ment membrane remodelling. Proteolysis is a common mechanism in interacting protein systems but usually does not involve proteases such as pepsin working at acidic pH. Recent data ([30,31] and our unpublished results) with endothelial cells interacting with laminin substrates at neutral pH show interference by RGD peptides suggesting that these cells may possess a functional activation mechanism. The elucidation of such mechanisms will be crucial in understanding the role of this cell adhesion reaction.

Acknowledgements: We thank Mrs H. Reiter and V. van Delden for technical assistance and the Deutsche Forschungsgemeinschaft for financial support (Project Ti 95/7-1).

REFERENCES

- [1] Rao, C.N., Margulies, I.M.K., Tralka, T.S., Terranova, V.P., Madri, J.A. and Liotta, L.A. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 9740-9744.
- [2] Timpl, R., Johansson, S., Van Delden, V., Oberbäumer, I. and Höök, M. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 8922-8927.
- [3] Terranova, V.P., Rao, C.N., Kalebic, T., Margulies, I.M. and Liotta, L.A. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 444-448.
- [4] Barsky, S.H., Rao, C.N., Hyams, D. and Liotta, L.A. (1984) *Breast Cancer Res. Treatm.* 4, 181-188.
- [5] Aumailley, M., Nurcombe, V., Edgar, D., Paulsson, M. and Timpl, R.J. (1987) *Biol. Chem.* 262, 11532-11538.
- [6] Nurcombe, V., Aumailley, M., Timpl, R. and Edgar, D. (1989) *Eur. J. Biochem.* 180, 9-14.
- [7] Engel, J., Odermatt, E., Engel, A., Madri, J.A., Furthmayr, H., Rohde, H. and Timpl, R. (1981) *J. Mol. Biol.* 150, 97-120.
- [8] Timpl, R. (1989) *Eur. J. Biochem.* 180, 487-502.
- [9] Sasaki, M., Kleinman, H.K., Huber, H., Deutzmann, R. and Yamada, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 16536-16544.
- [10] Ruoslahti, E. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57, 375-413.
- [11] Paulsson, M., Aumailley, M., Deutzmann, R., Timpl, R., Beck, K. and Engel, J. (1987) *Eur. J. Biochem.* 166, 11-19.
- [12] Ott, U., Odermatt, E., Engel, J., Furthmayr, H. and Timpl, R. (1982) *Eur. J. Biochem.* 123, 63-72.
- [13] Deutzmann, R., Huber, J., Schmetz, K.A., Oberbäumer, I. and Hartl, L. (1988) *Eur. J. Biochem.* 177, 35-45.
- [14] Risteli, L. and Timpl, R. (1981) *Biochem. J.* 193, 749-755.
- [15] Olsen, D.R., Nagayoshi, T., Fazio, M., Peltonen, J., Jaakkola, S., Sanborn, D., Sasaki, T., Kuivaniemi, H., Chu, M.-L., Deutzmann, R., Timpl, R. and Uitto, J. (1989) *Lab. Invest.* 60, 772-782.
- [16] Sasaki, M., Kato, S., Kohno, K., Martin, G.R. and Yamada, Y. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 935-939.
- [17] Mann, K., Deutzmann, R., Aumailley, M., Timpl, R., Raimondi, L., Yamada, Y., Pan, T., Conway, D. and Chu, M.-L. (1989) *EMBO J.* 8, 65-72.
- [18] Aumailley, M., Mann, K., Von der Mark, H. and Timpl, R. (1989) *Exp. Cell Res.* 181, 463-474.
- [19] Aumailley, M., Timpl, R. and Sonnenberg, A. (1990) *Exp. Cell Res.*, in press.
- [20] Sonnenberg, A., Modderman, P.W. and Hogervorst, F. (1988) *Nature* 336, 487-489.
- [21] Conforti, G., Zanetti, A., Colella, S., Abbadini, M., Marchisio, P.C., Pytela, R., Giancotti, F., Tarone, G., Languino, L.R. and Dejana, E. (1989) *Blood* 73, 1576-1585.
- [22] Pierschbacher, M.D. and Ruoslahti, E. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5985-5988.
- [23] Graf, J., Ogle, R.C., Robey, F.A., Sasaki, M., Martin, G.R., Yamada, Y. and Kleinman, H.K. (1987) *Biochemistry* 26, 6896-6900.

- [24] Pierschbacher, M.D. and Ruoslahti, E. (1984) *Nature* 309, 30-33.
- [25] Engel, J. (1989) *FEBS Lett.* 251, 1-7.
- [26] Mann, K., Deutzmann, R. and Timpl, R. (1988) *Eur. J. Biochem.* 178, 71-80.
- [27] Hynes, R.O. (1987) *Cell* 48, 549-554.
- [28] Iwamoto, Y., Robey, F.A., Graf, J., Sasaki, M., Kleinman, H.K., Yamada, Y. and Martin, G.R. (1987) *Science* 1132-1134.
- [29] Panayotou, G., End, P., Aumailley, M., Timpl, R. and Engel, J. (1989) *Cell* 56, 93-101.
- [30] Basson, C.T., Knowles, W.F. and Madri, J.A. (1987) *J. Cell Biol.* 105, 44a.
- [31] Grant, D.S., Tashiro, K.-I., Segui-Real, B., Yamada, Y., Martin, G.R. and Kleinman, H.K. (1989) *Cell* 58, 933-943.

11